

Extracelluláris vezikulák izolálása és detektálási módszerei

Dr. Kovács Árpád Ferenc

2016. 10. 5

Ōsumi Yoshinori japán tudós



"For the greatest benefit to mankind"
Alfred Nobel

The Nobel Assembly at Karolinska Institutet has today decided to award the

2016 NOBEL PRIZE IN PHYSIOLOGY OR MEDICINE

A stylized, high-contrast portrait of Yoshinori Ohsumi. He is depicted with a beard and glasses, wearing a dark suit jacket, a white shirt, and a blue patterned tie. The portrait uses a limited color palette of black, white, yellow, and blue.

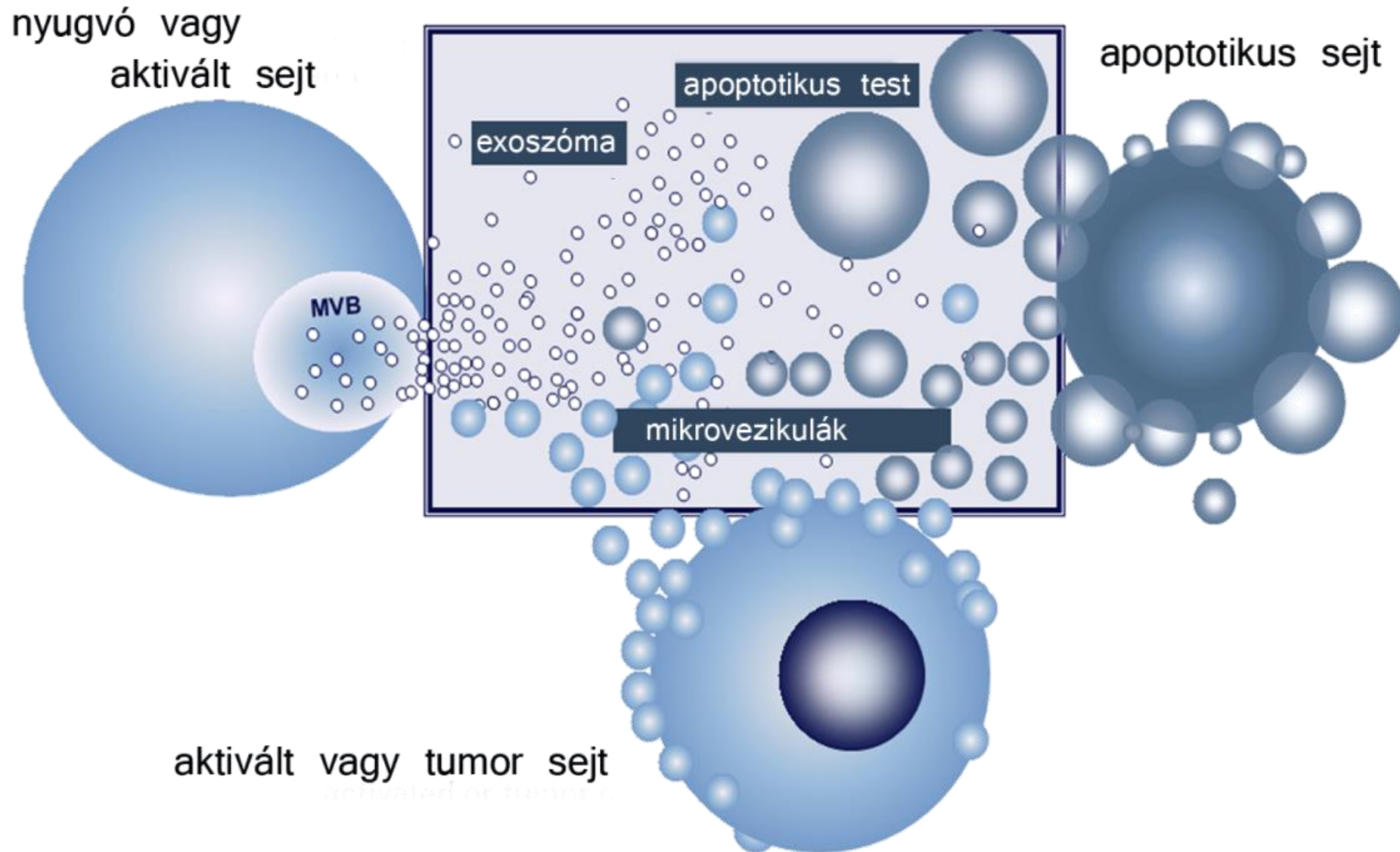
Yoshinori Ohsumi

"for his discoveries of mechanisms for autophagy"

Nobelprize.org



ÁTTEKINTÉS (1)



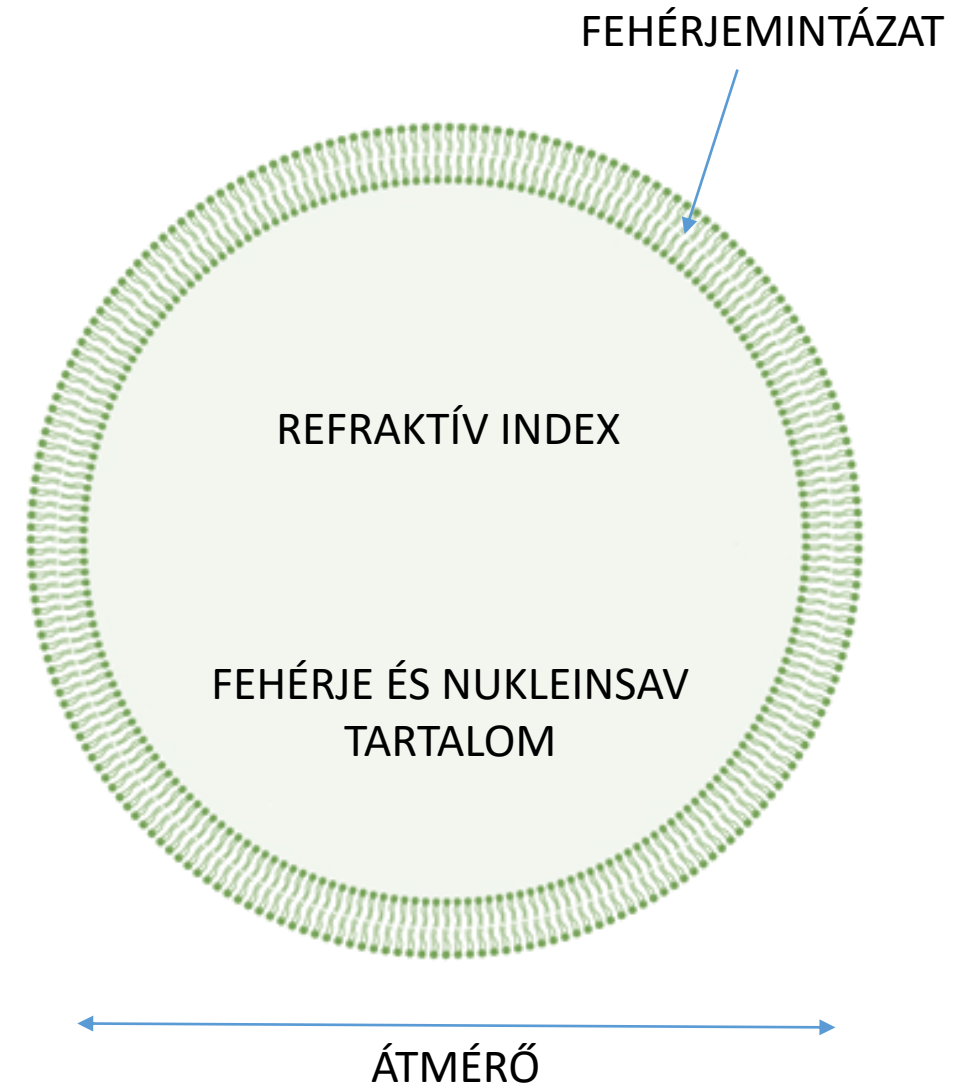
ÁTTEKINTÉS (2)

I. Izolálási módszerek

1. Differenciál centrifugálás
2. Sűrűség gradiens centrifugálás (szukróz vagy iodixanol)
3. Méret-eloszlásos/kizárásos kromatográfia – SEC , qEV
4. Ultrafiltráció
5. Precipitációs módszerek –PEG, PROSPR
6. Mágneses szeparálás
7. Fluoreszcencia aktivált vezikula szeparálás - FAVS

II. Detektálási módszerek

1. Áramlási citometria- FC
2. Elektronmikroszkópia – TEM/SEM
3. Atomerőmikroszkópia - AFM
4. Rezisztív pulzus érzékelés – qNano IZON
5. Dinamikus fényszórás - DLS
6. Nanopartikulum követő analízis - NTA
7. Mikrofluidika
8. Raman spektroszkópia



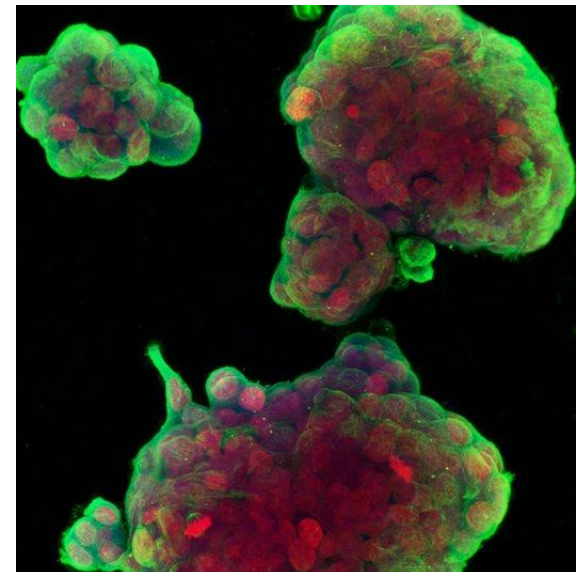
I. EXTRACELLULÁRIS VEZIKULÁK IZOLÁLÁSI MÓDSZEREI

IZOLÁLÁS (1)



In vitro rendszerek

1. Sejtkultúra
2. 3D sejtenyészet
3. Szöveti explantátum
4. Transwell rendszer



Humán / állat minták

1. Plazma
2. Vizelet
3. Nyálminta
4. Perikardiális folyadék
5. Szinoviális folyadék
6. Malignus ascites
7. Magzatvíz
8. Anyatej



IZOLÁLÁS (2)

Vezikula tulajdonságok kiaknázása az izolálás során

Vezikulák biofizikai tulajdonságai (Exo<MV<AB)

Differenciál centrifugálás

Sűrűség gradiens centrifugálás

Méret-eloszlásos kromatográfia – SEC

Ultrafiltráció

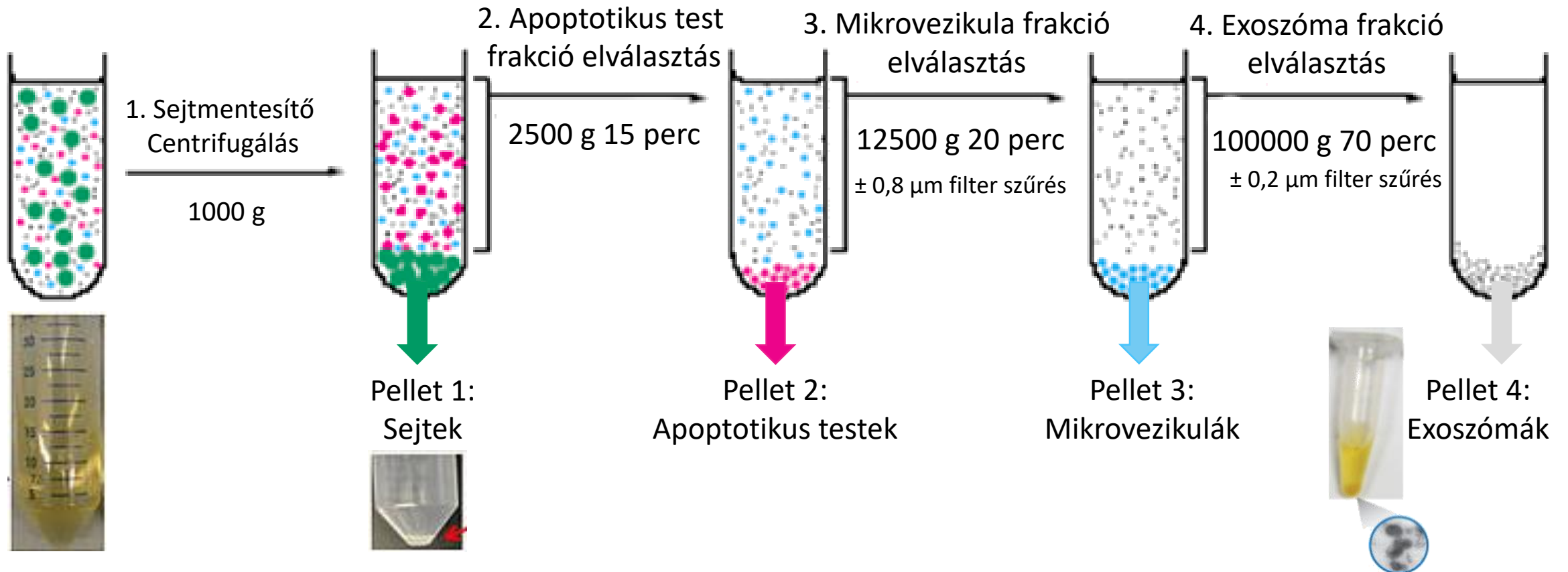
Vezikulafelszín fehérjemintázata

Mágneses szeparálás

Fluoreszcencia aktivált vezikula szeparálás - FAVS

I. 1 DIFFERENCIÁL CENTRIFUGÁLÁS (1)

Legszélesebb körben alkalmazott és standardizált izolálási módszer

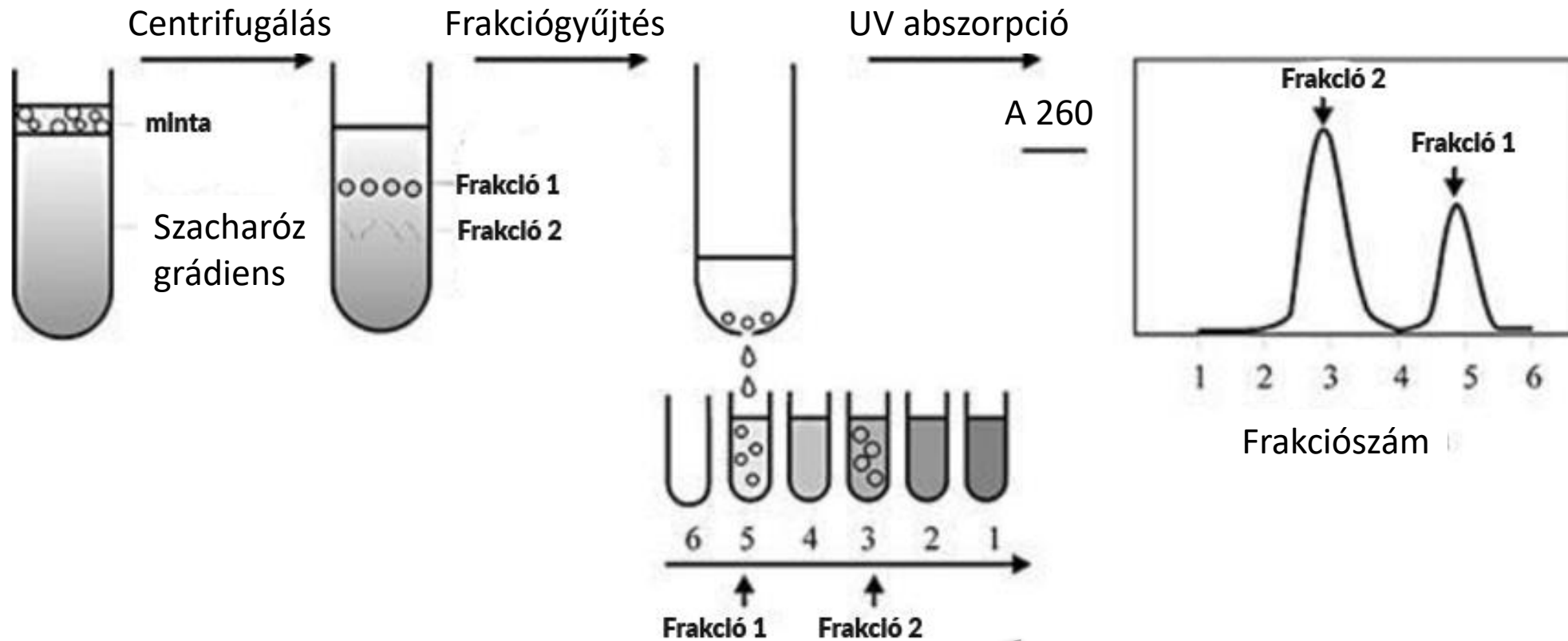


I. 1 DIFFERENCIÁL CENTRIFUGÁLÁS (2)



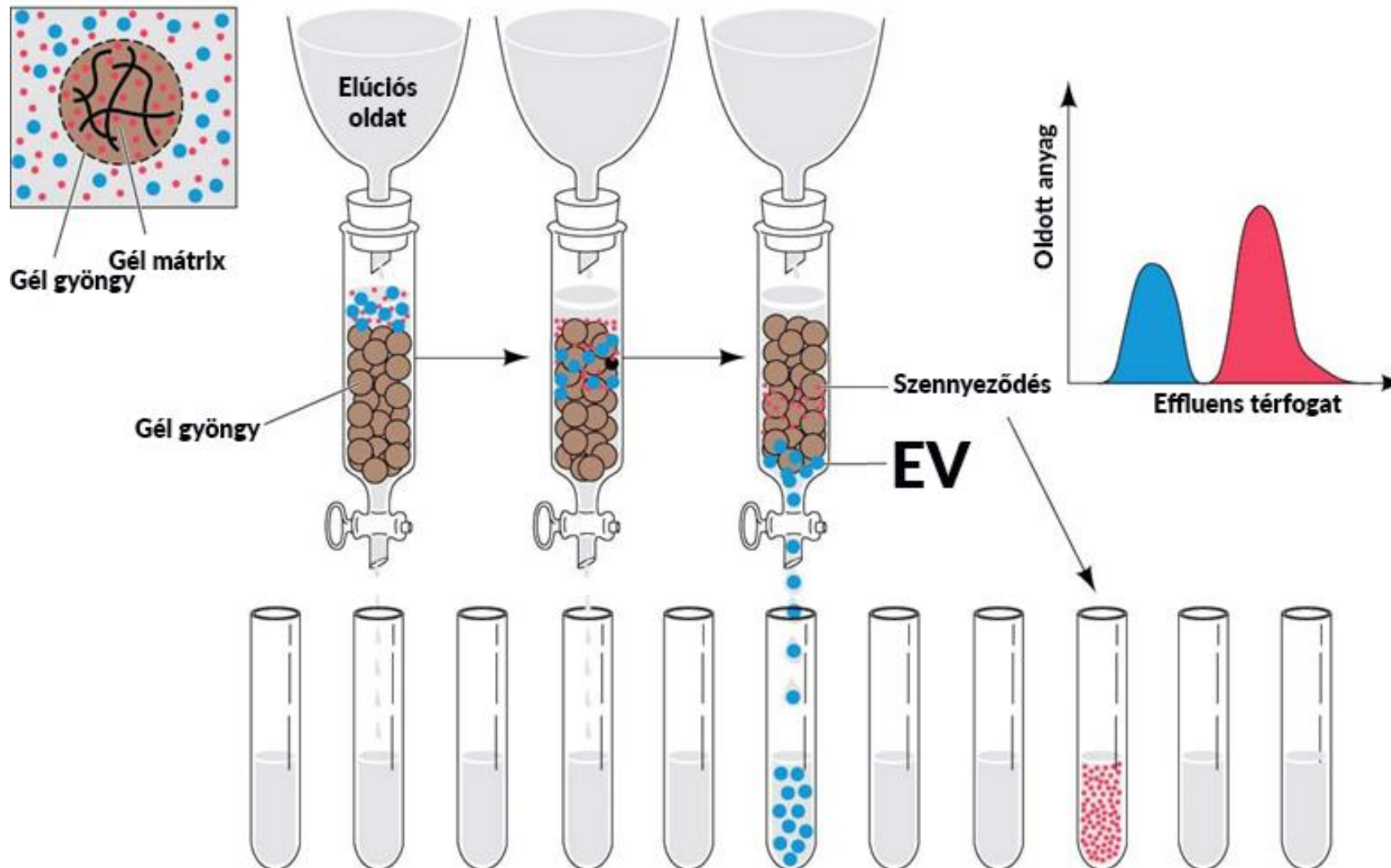
I. 2 SŰRŰSÉG GRÁDIENS CENTRIFUGÁLÁS

Ultracentrifugálás szukróz vagy iodixanol sűrűség grádiensen, EV alpopulációk elkülönítésére

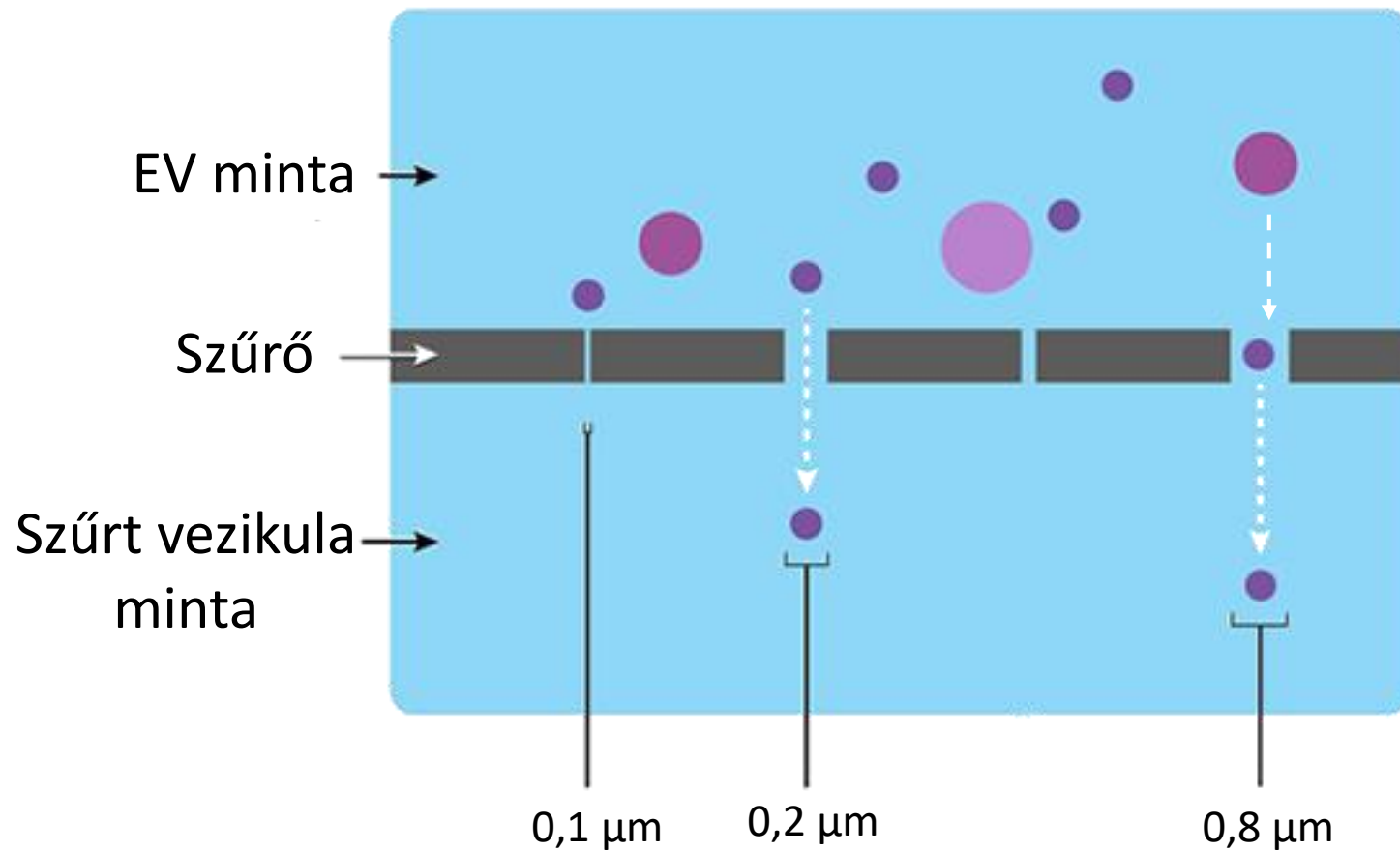


I. 3 MÉRET ELOSZLÁSOS KROMATOGRÁFIA

Hatékony és gyors módszer, eltávolítja a szennyező ágensek nagy részét; kevés mintamennyiség dolgozható fel



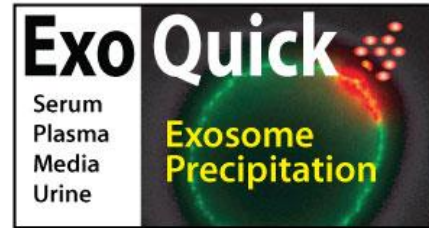
I. 4 FILTRÁCIÓ



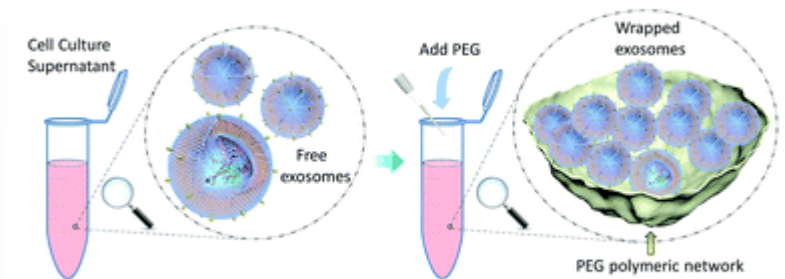
I. 5 POLIMÉR ALAPÚ IZOLÁCIÓS MÓDSZEREK

Kevésbé tiszta EV populációt izoláló módszer: polimér interferencia, illetve szolubilis faktor szennyeződés

Exoquick (System Bioscience)



Total exosome Isolation Kits (Life Technologies)

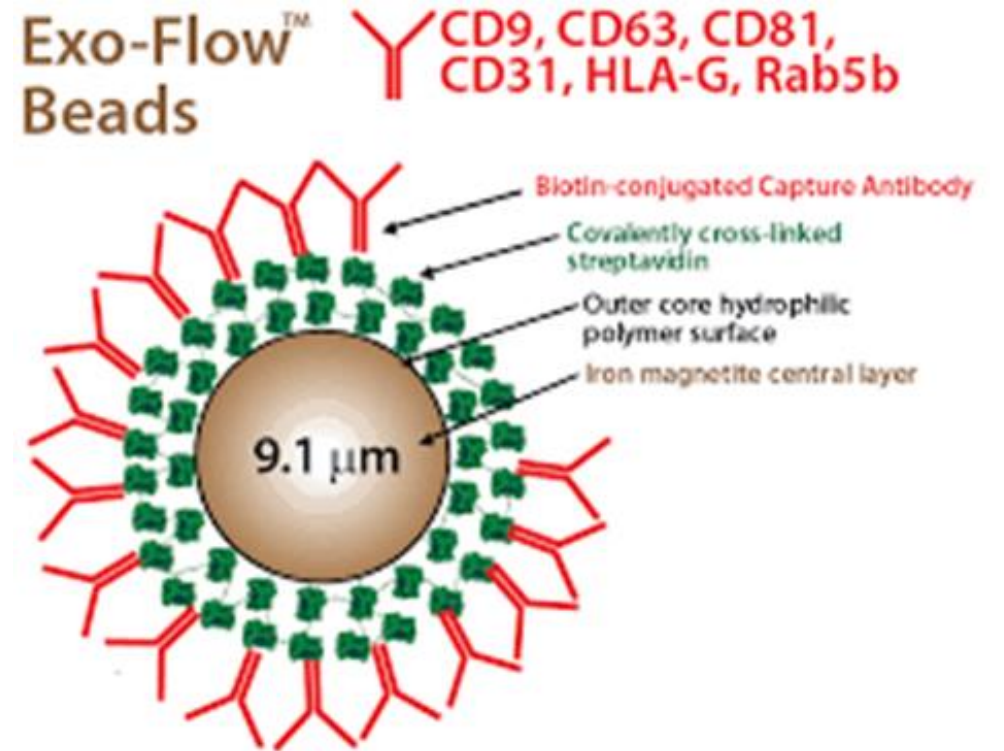
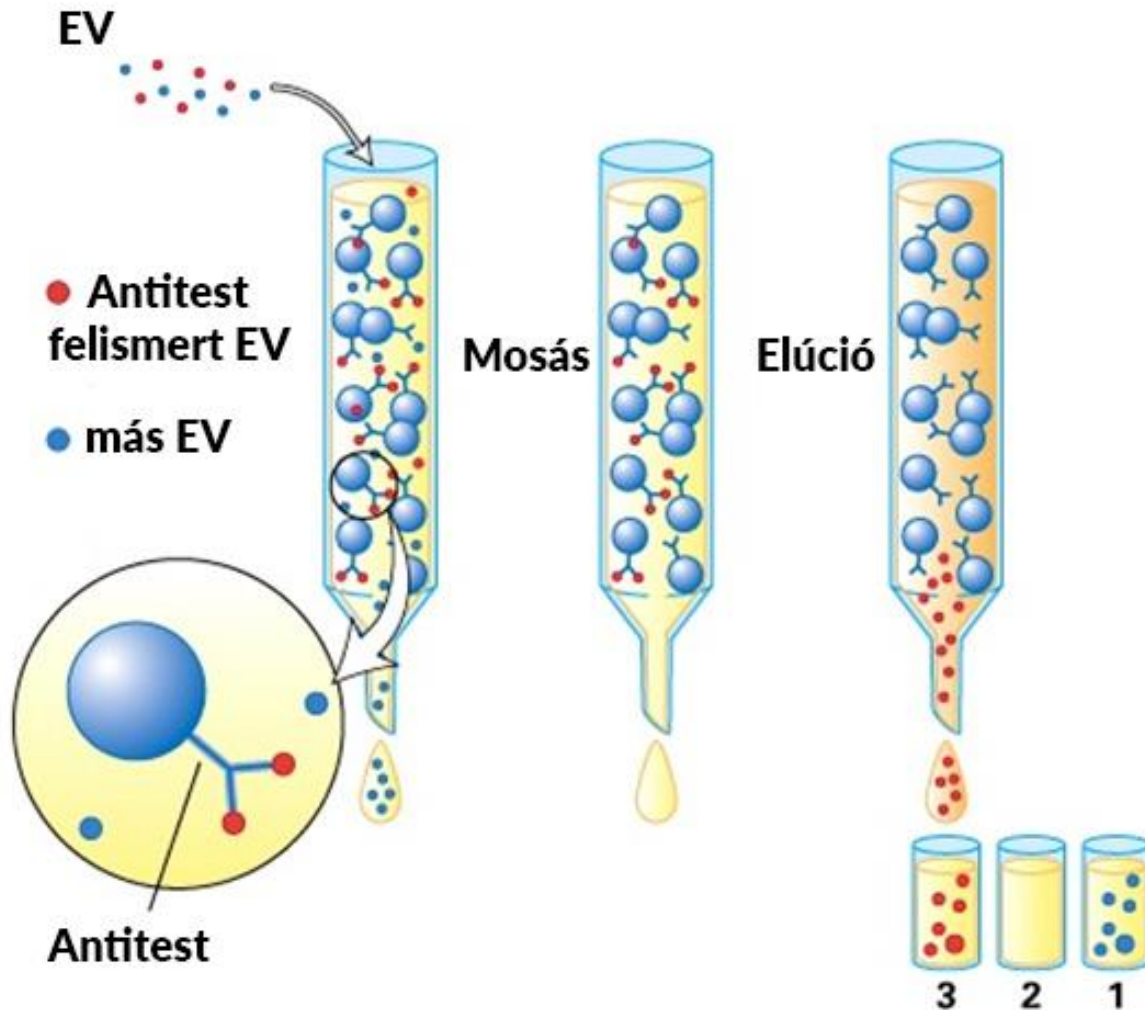


Urine exosome RNA Isolation Kit (NORGEN, Biotek Corp.)



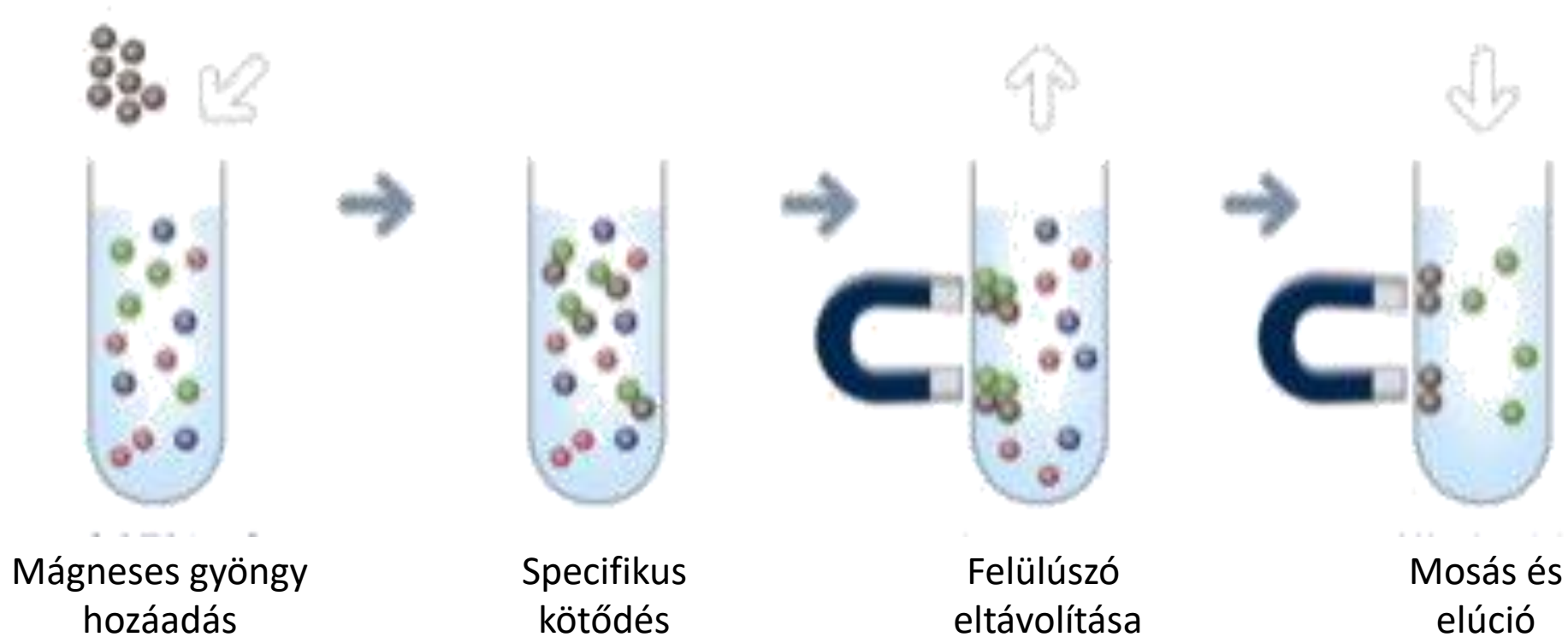
I. 6 AFFINITÁS MÓDSZEREK (1)

A vezikulafelszín egy adott specifikus fehérje alapján specifikus EV alpopuláció izolálása

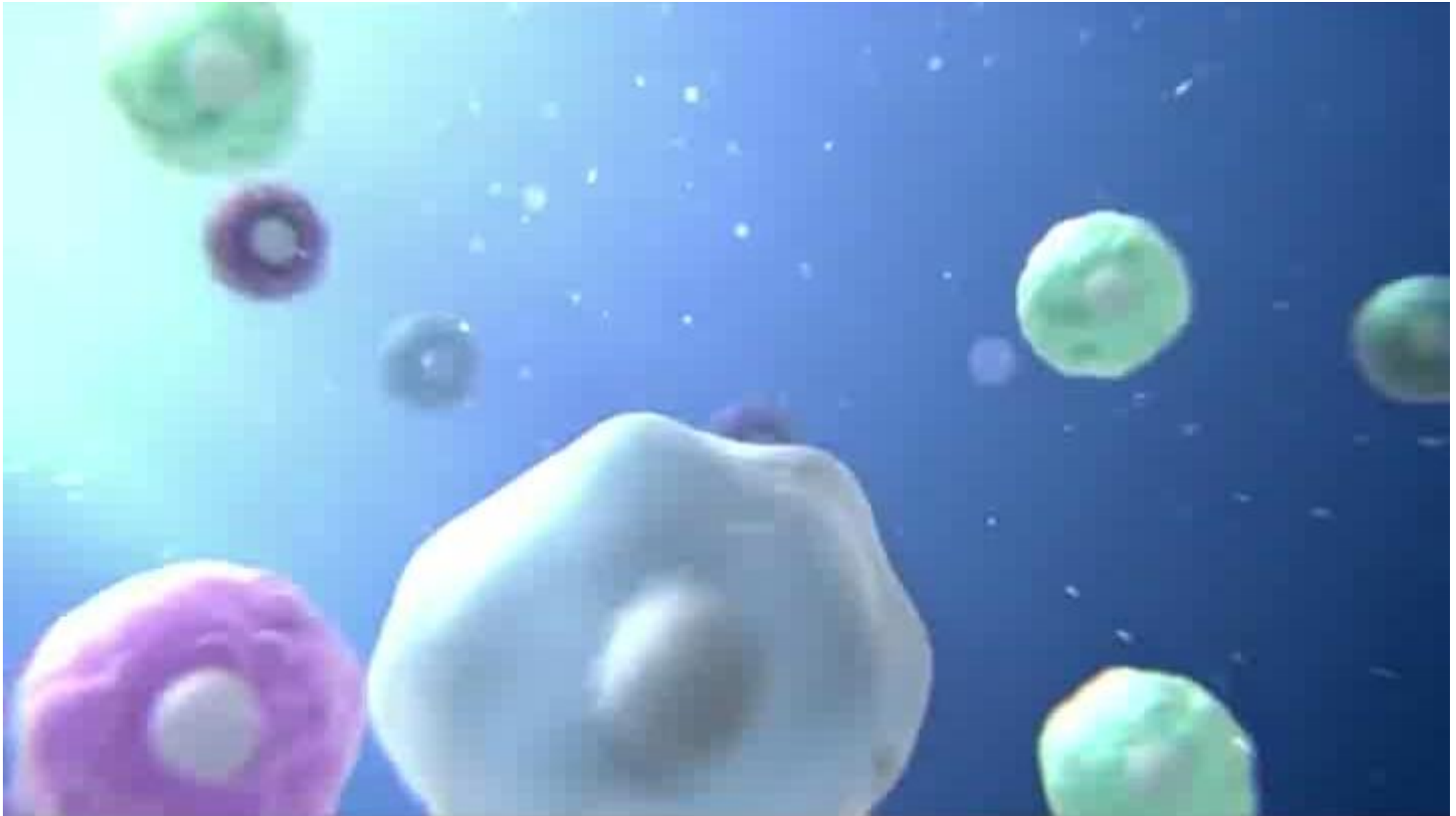


I. 6 AFFINITÁS MÓDSZEREK (2)

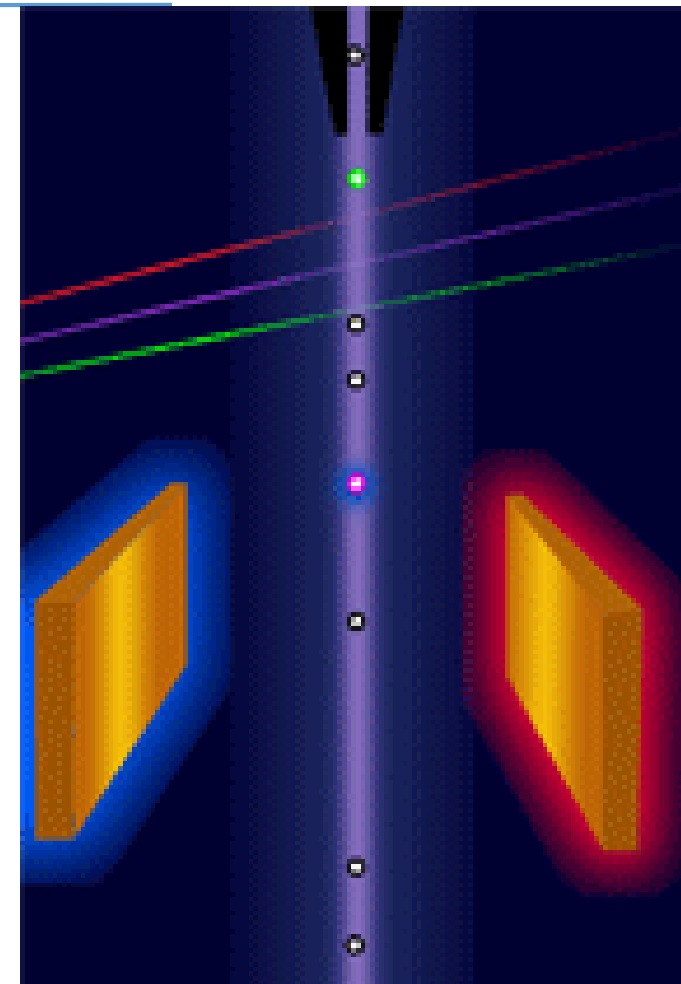
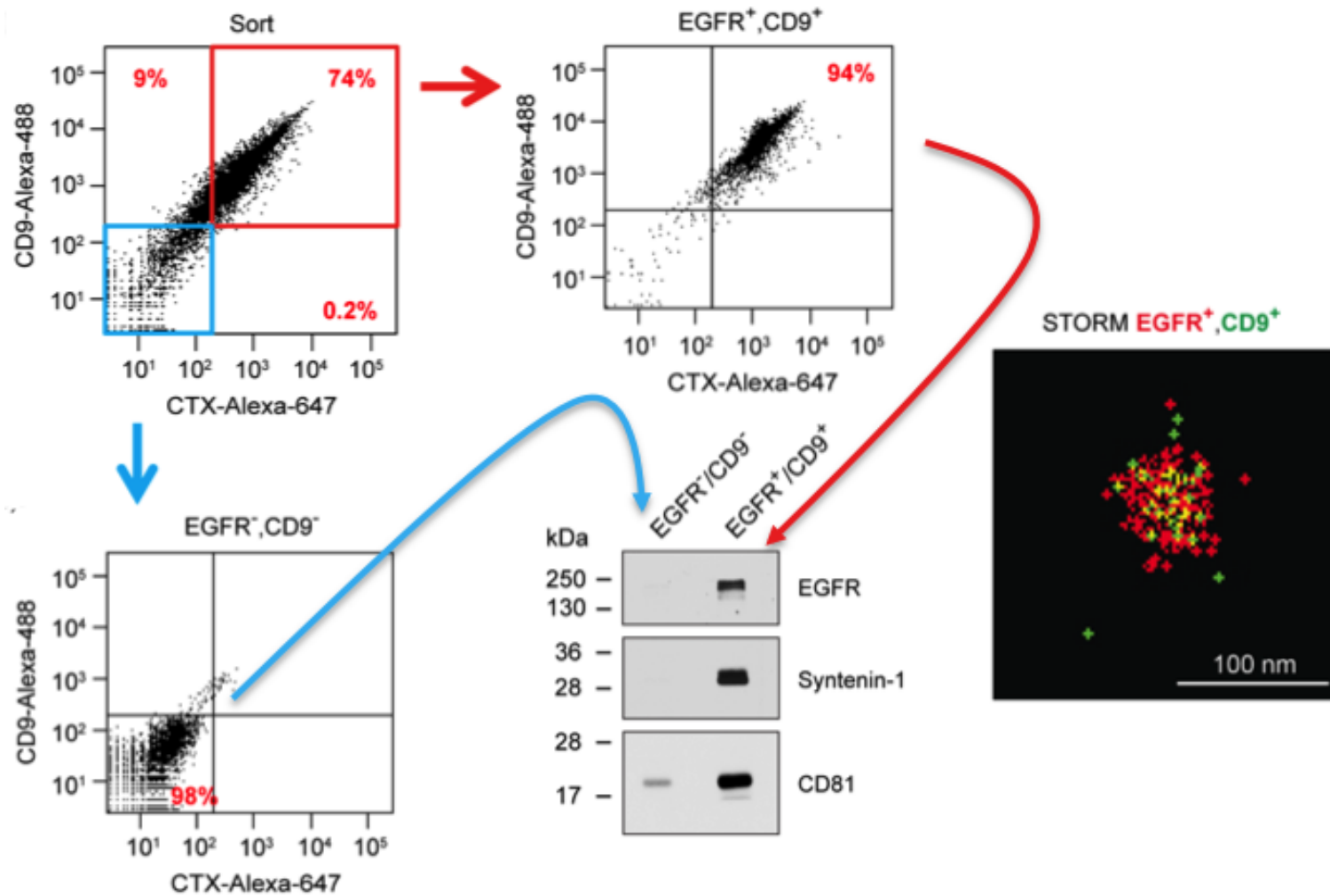
A vezikulafelszín egy adott specifikus fehérje alapján specifikus EV alpopuláció izolálása



I. 7 ÁRAMLÁSI CITOMETRIA



I. 7 FLUORESCENCIA AKTIVÁLTA VEZIKULA SZORTOLÁS



II. EXTRACELLULÁRIS VEZIKULÁK DETEKTÁLÁSI MÓDSZEREI

DETEKTÁLÁS (1)

"Populációs" szintű vizsgálatok	Fehérje tartalom / összetétel	WB (western blot analízis)
		MS (tömegspektrometria)
	Fehérje/lipid arány meghatározás	Protein/lipid assay
	Nukleinsav tartalom / összetétel	PCR
"Individuális" szintű vizsgálatok	Fényszóráson alapuló optikai módszerek	FACS (áramlási citometria) konvencionális és magas felbontású
		DLS (dinamikus fényszórás)
		NTA (nano tracking analysis)
	Fluoreszcens optikai módszerek	FACS (áramlási citometria)
		fluoreszcens mikroszkópia
		STED mikroszkópia (szuperrezolúciós fénymikroszkópia)
		F-NTA (fluoreszcens nano tracking analysis)
	Nem optikai módszerek	TEM (transzmissziós elektronmikroszkópia)
		AFM (atomerő mikroszkópia)
		Impedancia alapú flow cytometria

DETEKTÁLÁS (2)

Vezikulák mérete (Exo<MV<AB)

Áramlási citométer

NTA

TRPS

DLS

Vezikula fehérjetartalom

EV array – protein microarray

Tömegspektrometria

Western Blot

Vezikulafelszín fehérjemintázata

Áramlási citométer– PS, tetraspanin detektálás

ELISA

Vezikula nukleinsav tartalom

miRNS

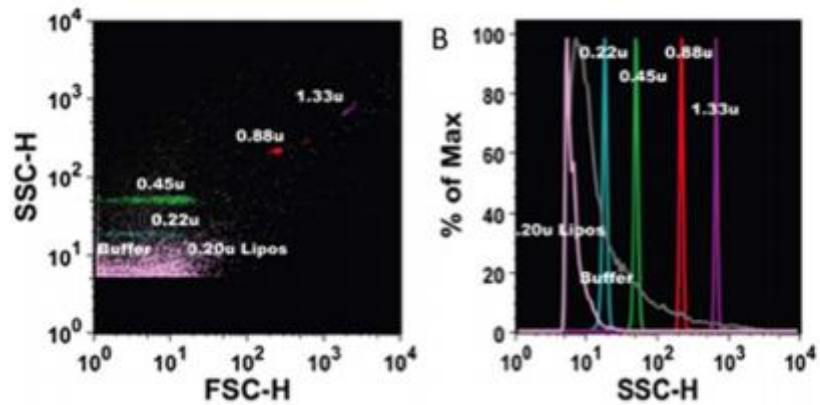
mRNS

DNS

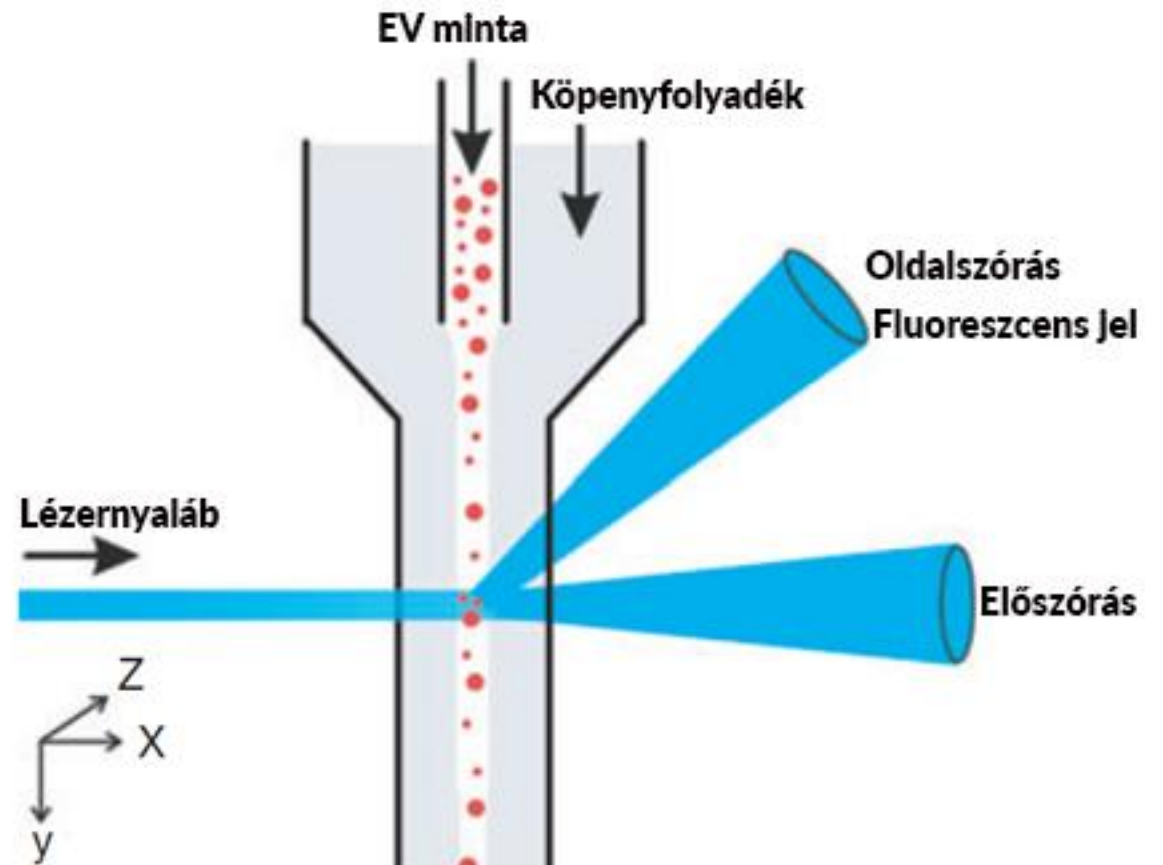
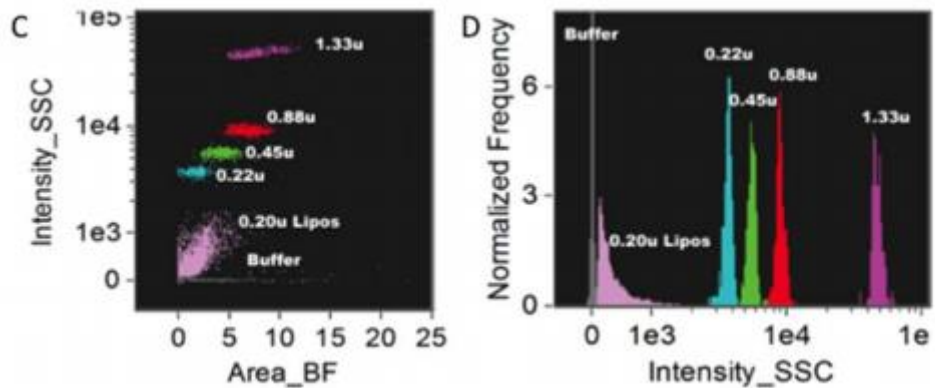
II. ÁRAMLÁSI CITOMETRIA- FACS

FLOW CYTOMETRY

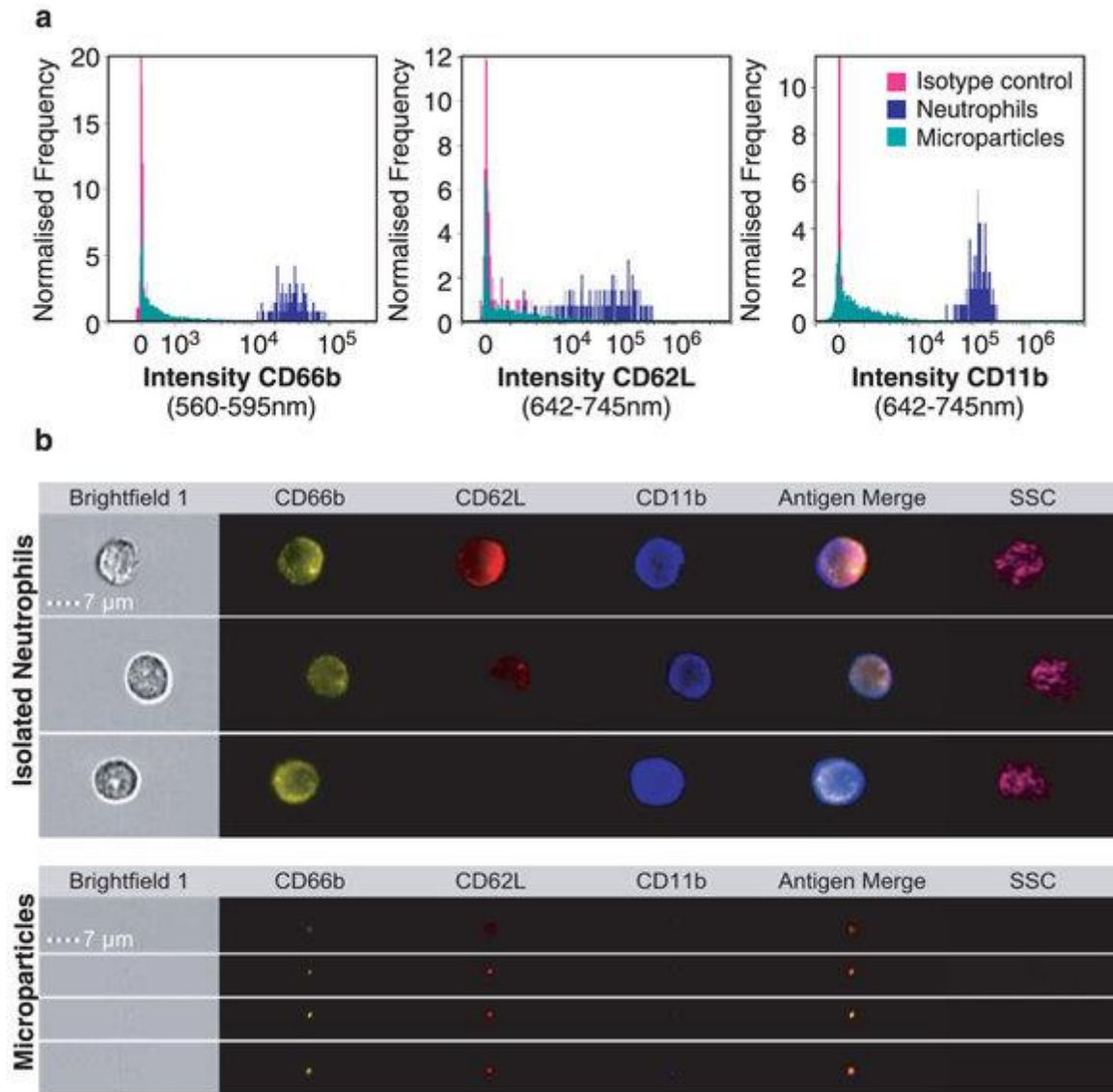
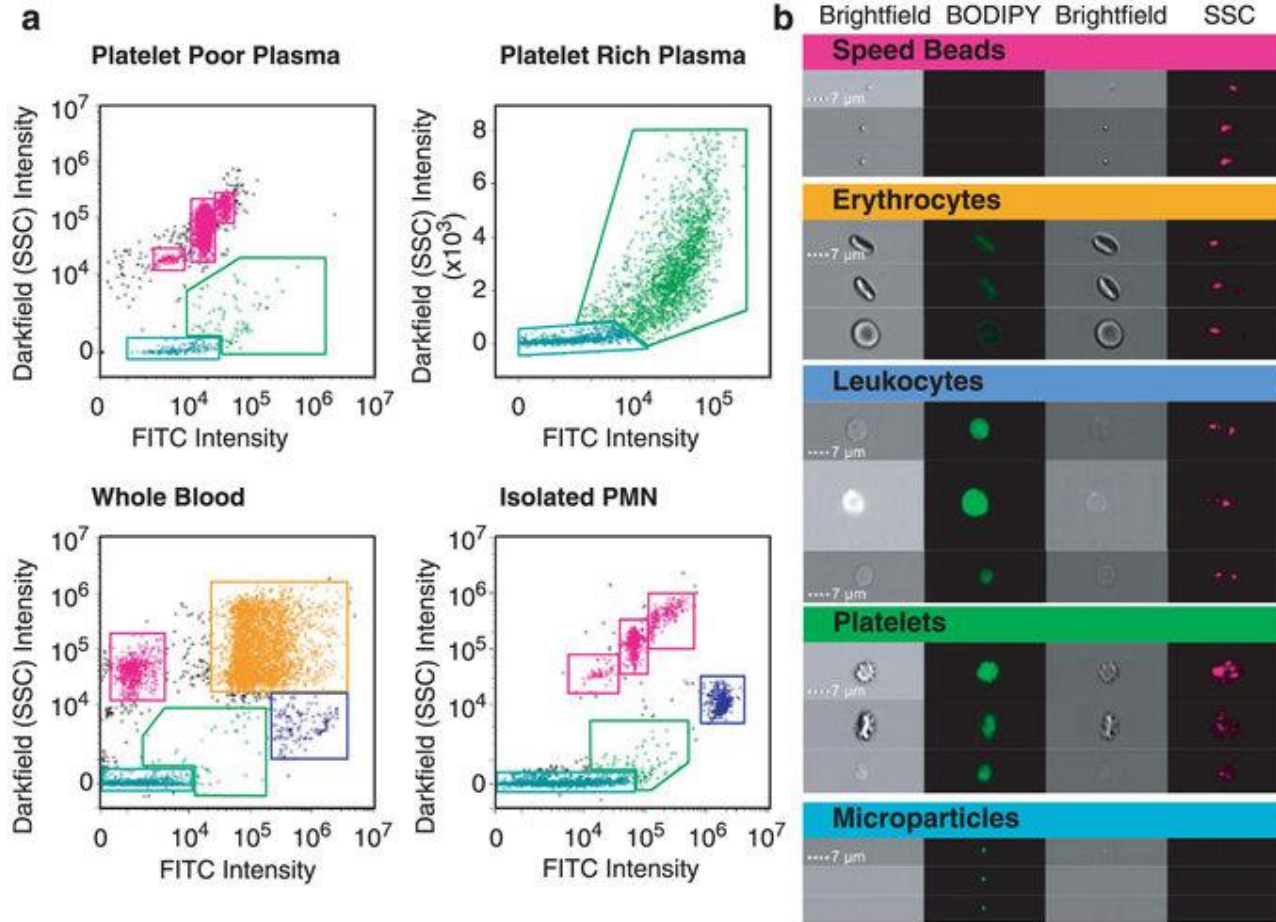
Konvencionális citométer – BD FACSCalibur



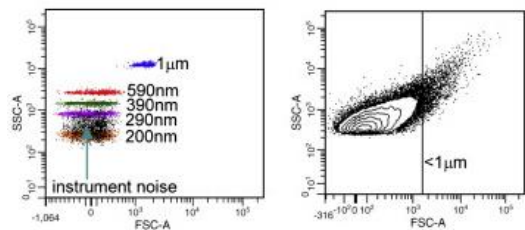
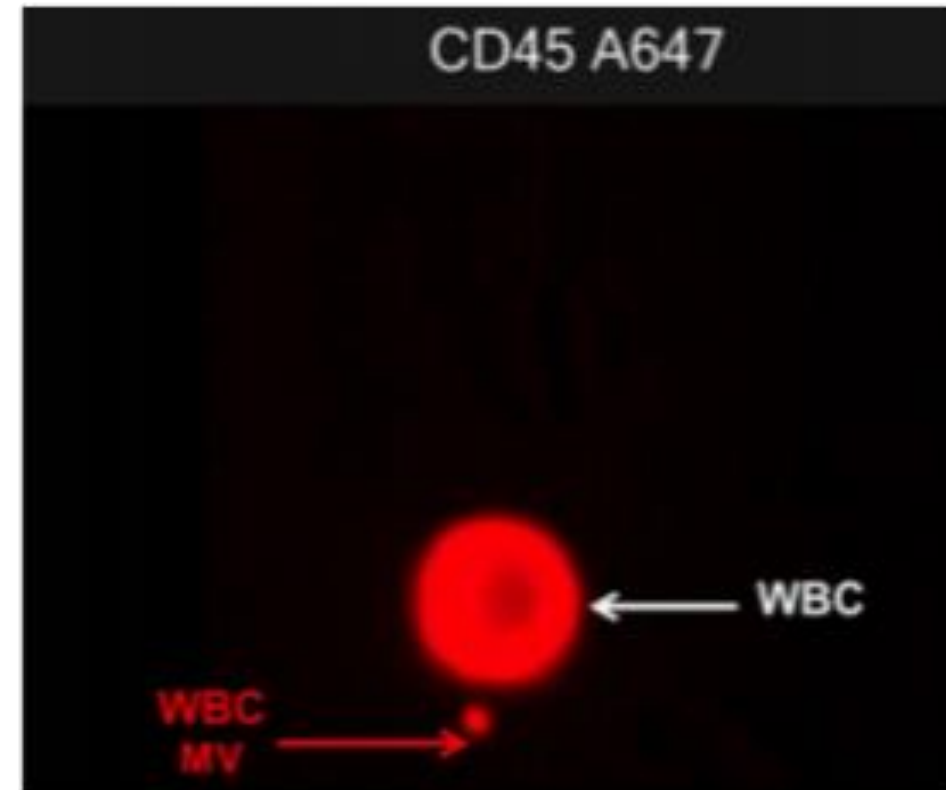
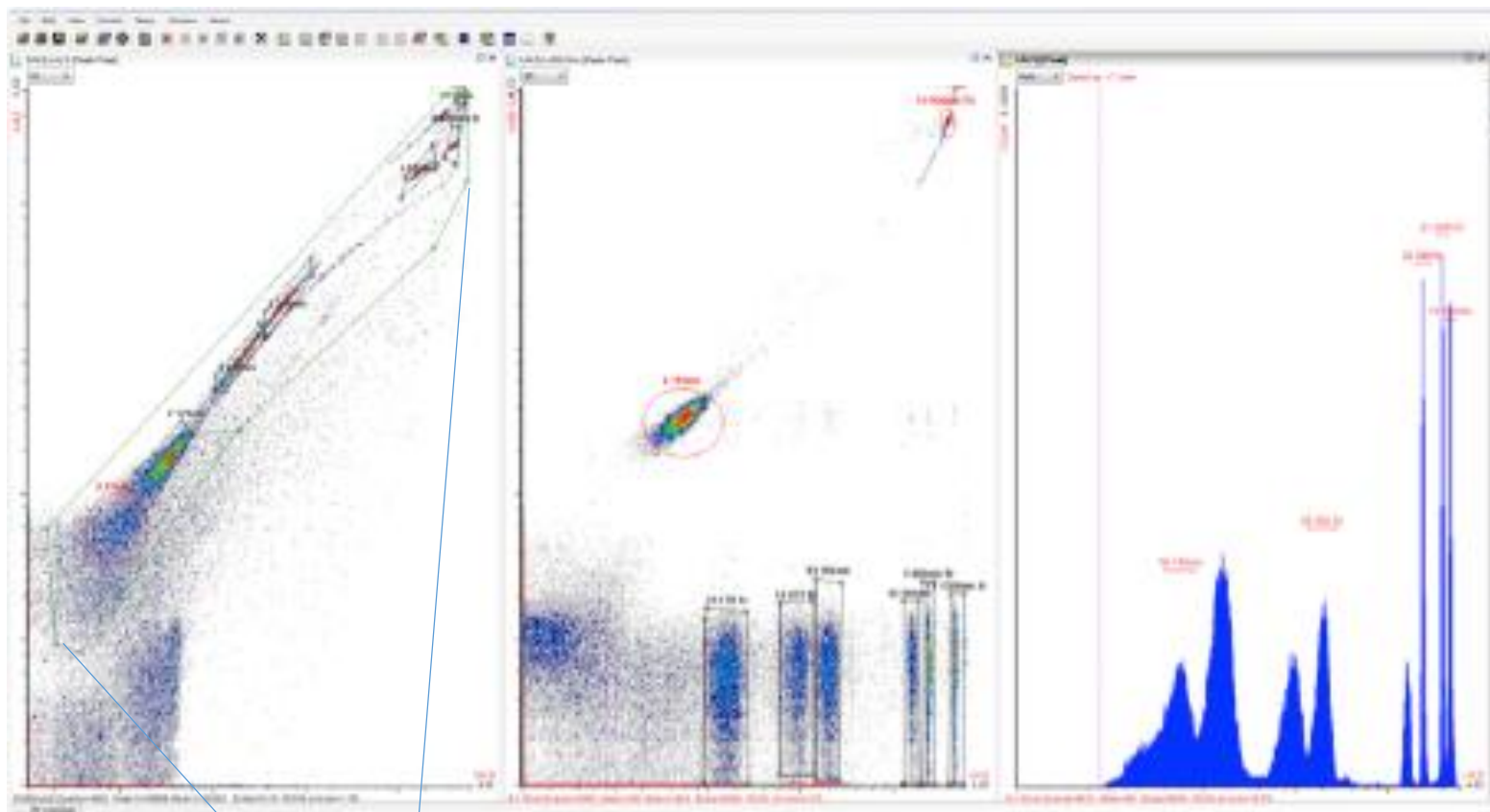
Magas felbontású citométer – ApogeeA50 Micro



II. KÉPALKOTÓ ÁRAMLÁSI CITOMETRIA - IMAGESTREAM^x

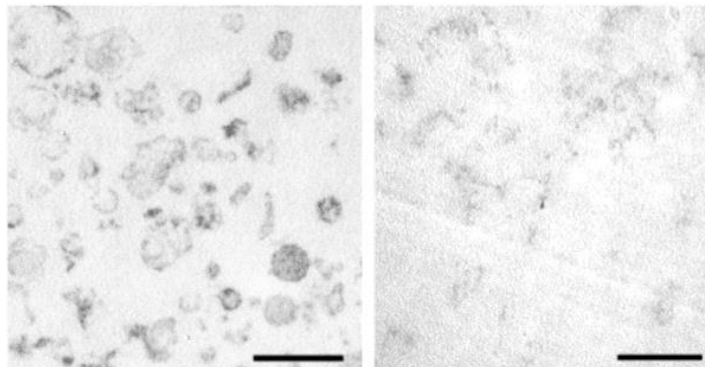
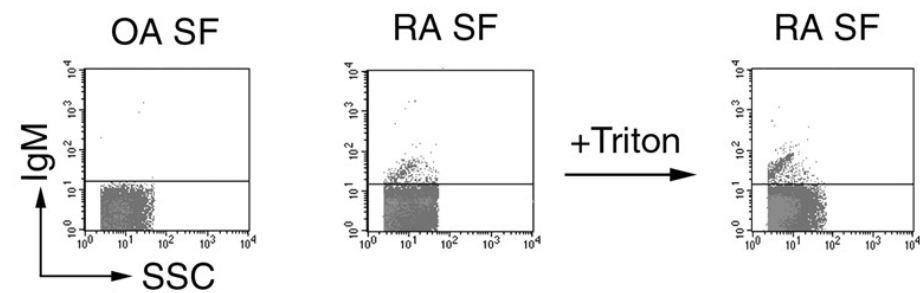
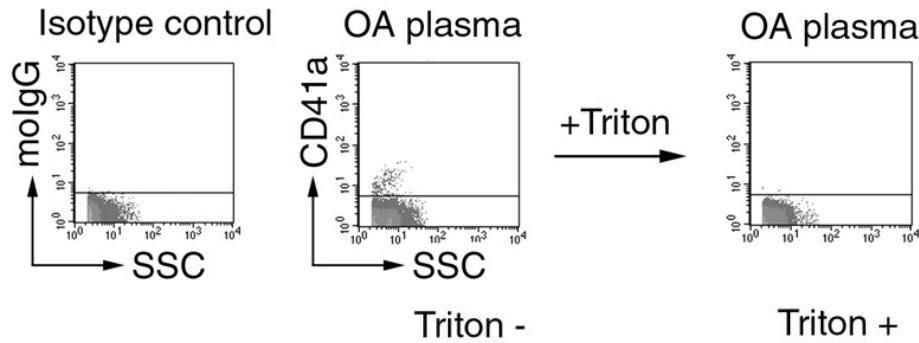
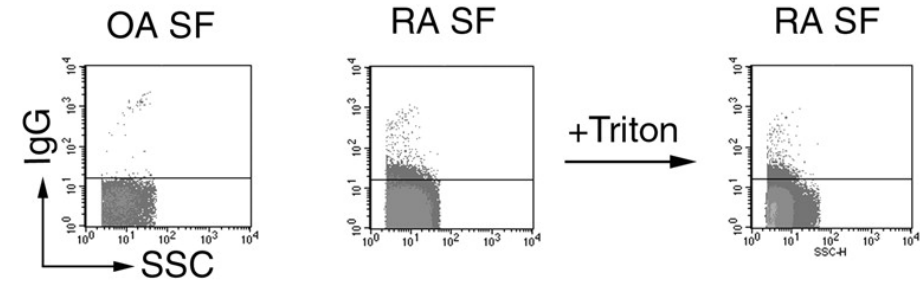
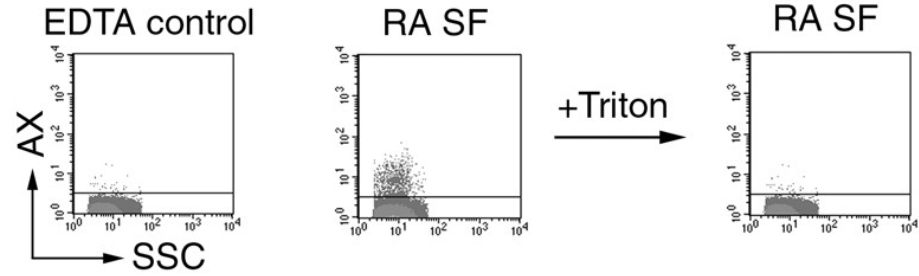


II. MAGAS FELBONTÁSÚ ÁRAMLÁSI CITOMETRIA

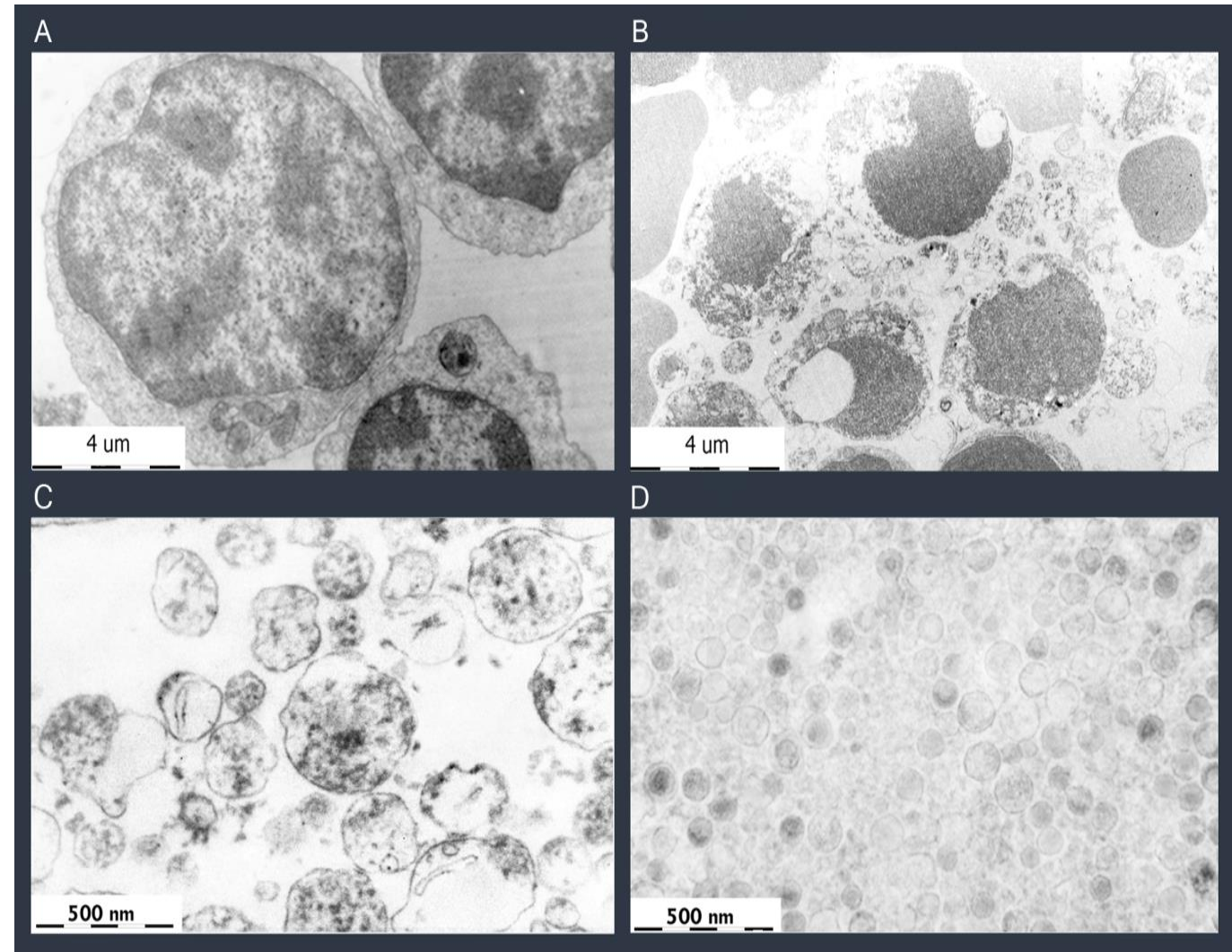


II. ÁRAMLÁSI CITOMETRIA

DIFFERENCIÁL DETERGENS LÍZIS

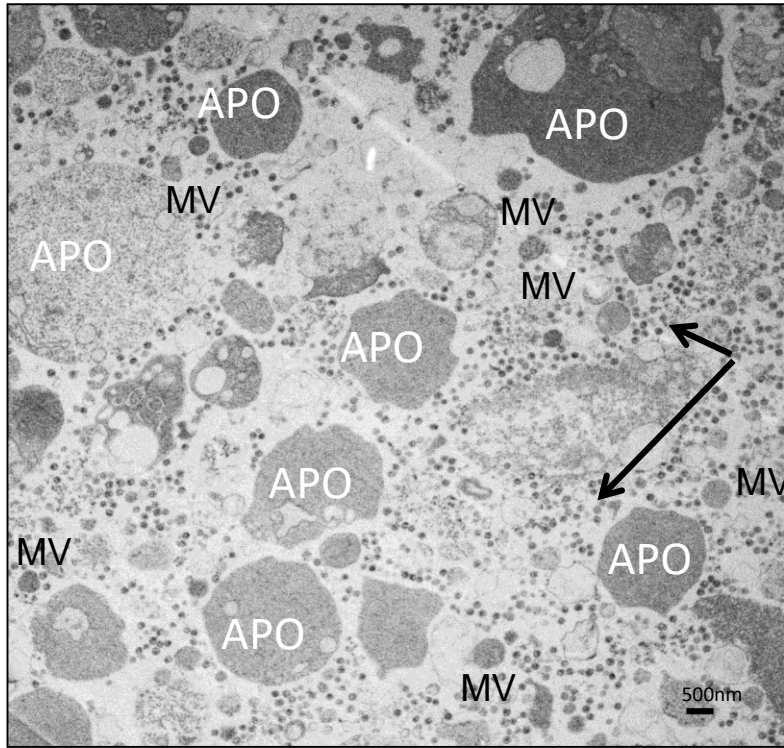


II. TRANZMISSZIÓS ELEKTRONIKROSZÓPIA - TEM

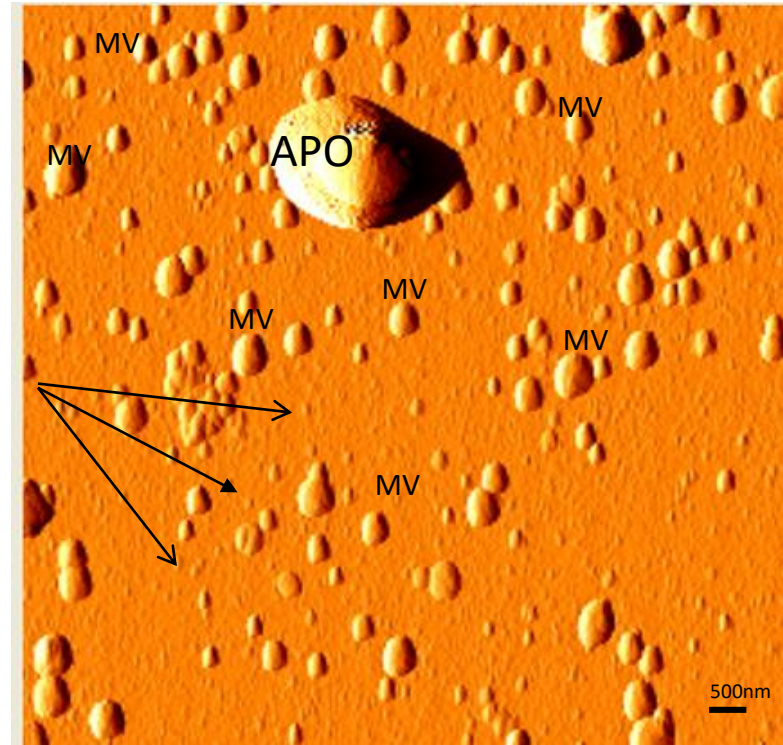


Transzmissziós elektronmikroszkópos felvételek, BALB/c thymus eredetű
A: sejtek, B: apoptotikus testek, C: mikrovezikulák, D: exoszómák

II. TEM és ATOMERŐ MIKROSZÓPIA

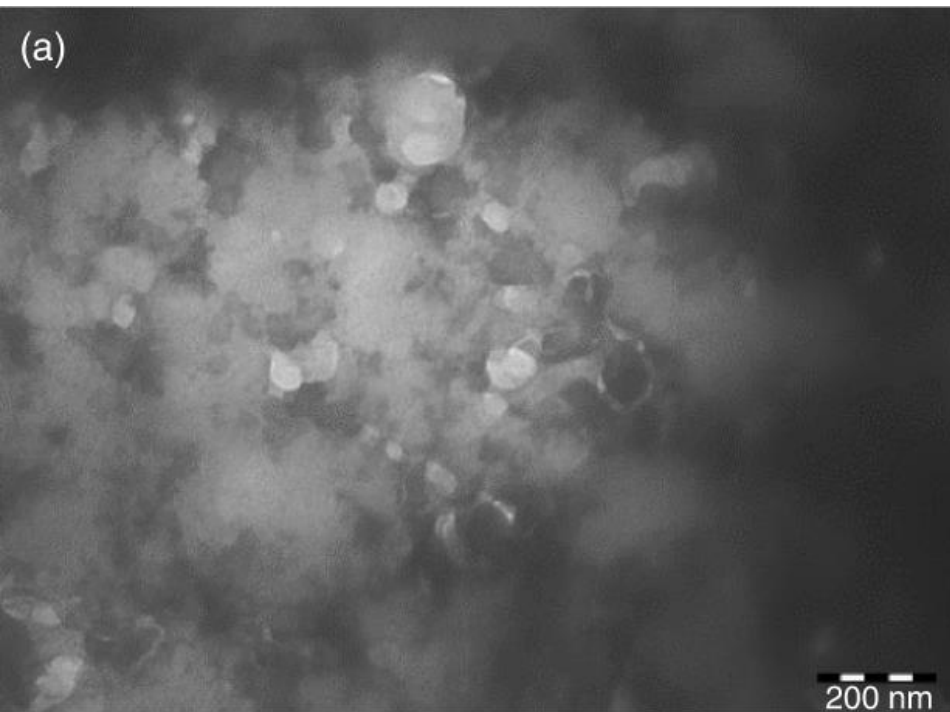


Exoszóma

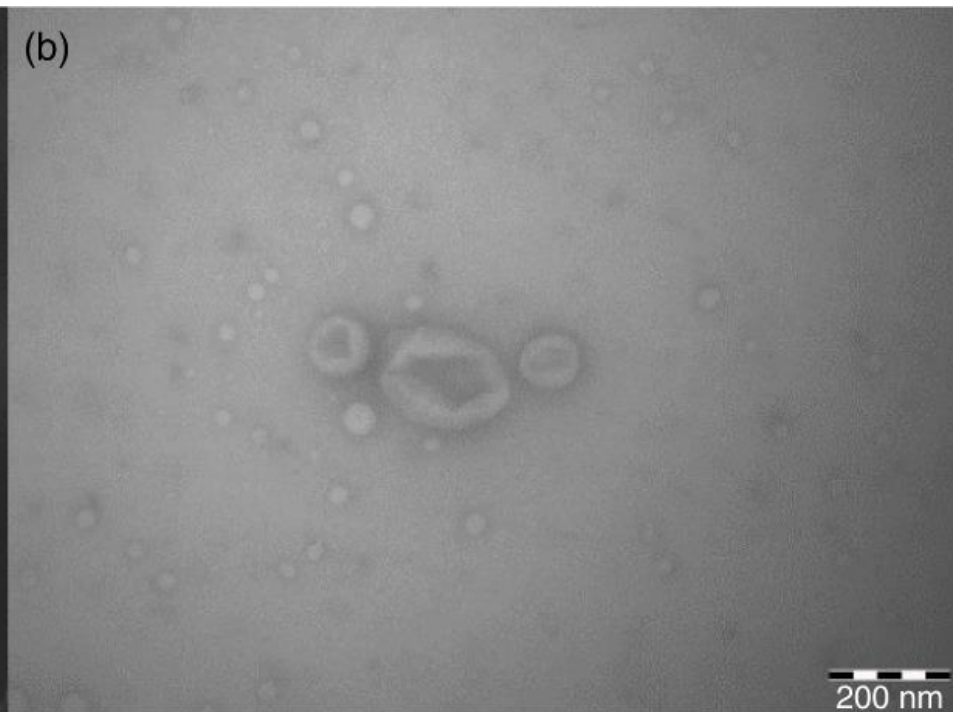


Buzás et al 2014

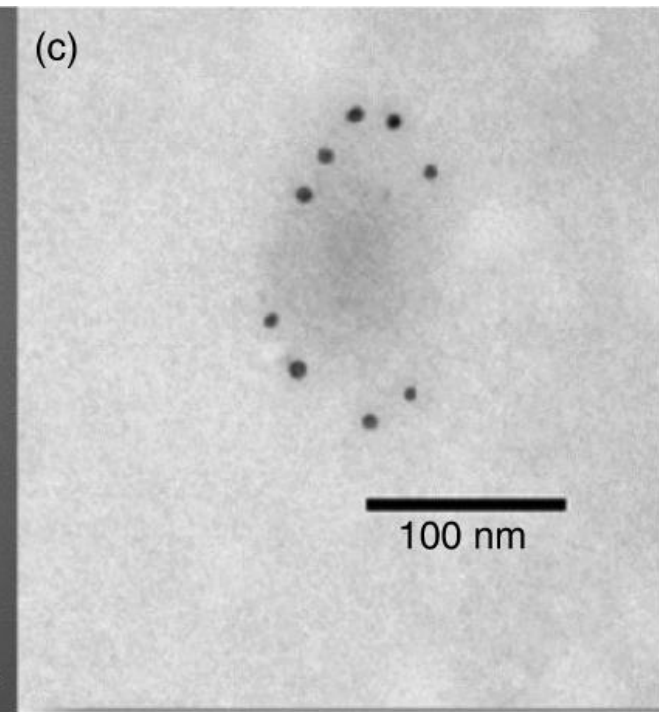
II. TEM – PLAZMA MINTA



Izolálás előtt



Izolálás után



CD9⁺ jelölés

II. PÁSZTÁZÓ ELEKTRONMIKROSKÓPIA - TSEM

Transzmissziós módban

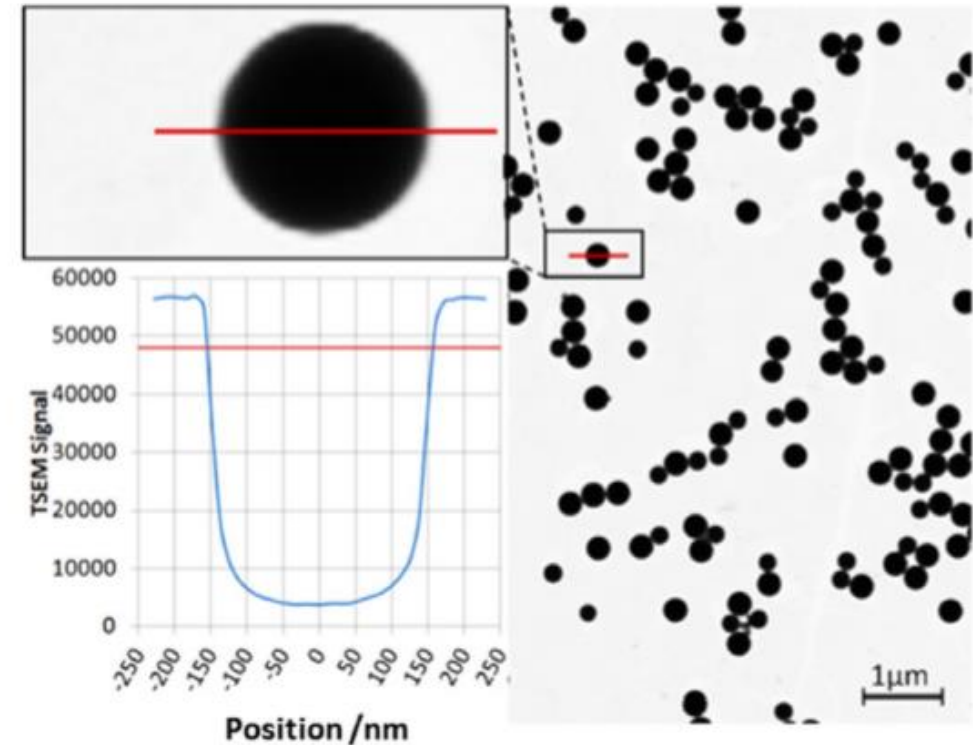
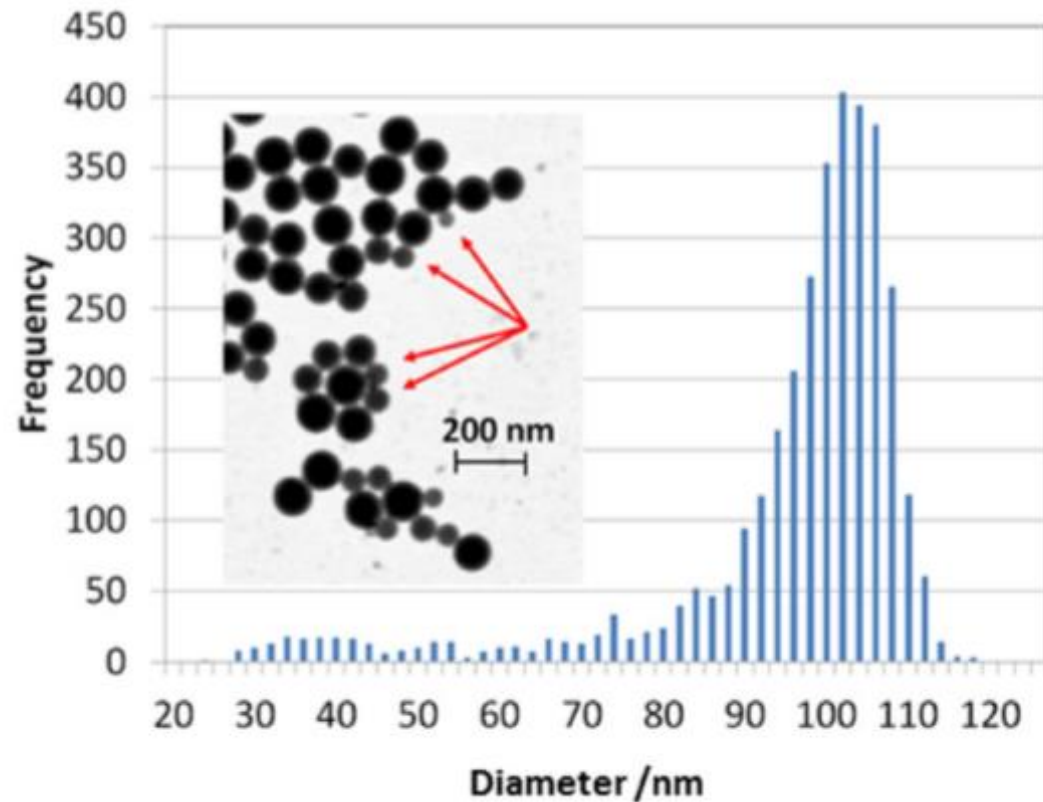


Figure 4. Example of the TSEM image of the sample PS_bim (table 2). Upper inset: 5-fold magnification of the main image showing an individual 315 nm PS particle. Lower inset shows the corresponding TSEM signal profile together with the threshold level indicating the particle boundary.

II. KONFOKÁLIS MIKROSZÓPIA

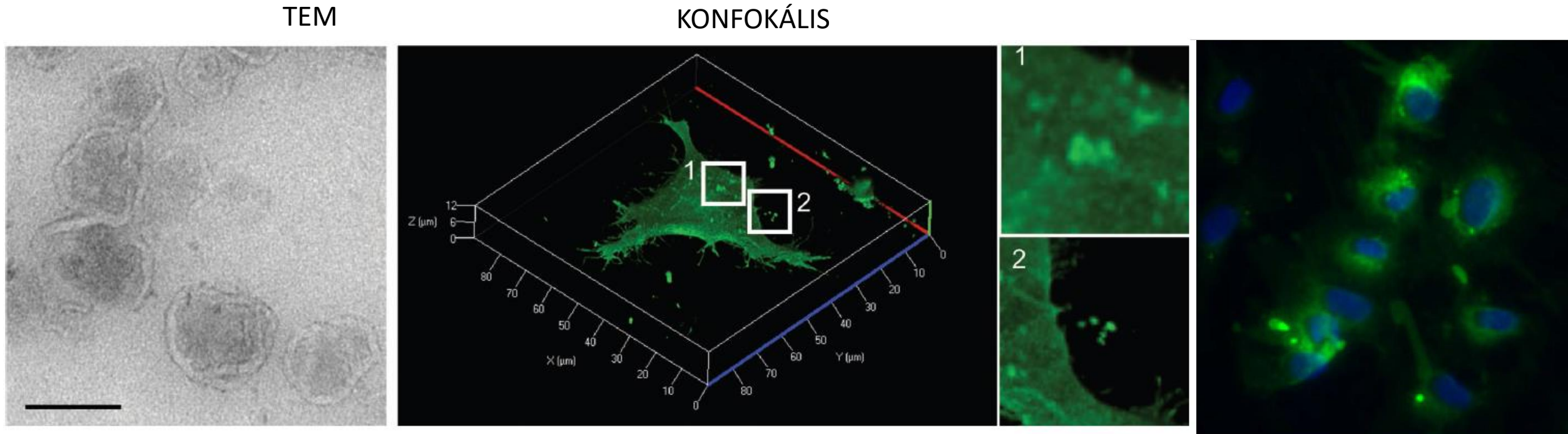


Figure 3. A visualization of extracellular vesicles. (a) A transmission electron micrograph showing extracellular vesicles (EVs) isolated from HEK293T cells. Note the lipid bilayer–enclosed vesicle characteristic of EVs. Bar, 100 nanometers. (b) Live-cell confocal microscopy of human embryonic kidney (HEK) 293T cells expressing palmitoylated GFP (PalmGFP). Plasma membranes are labeled with PalmGFP, allowing the observation of bud-like structures on the cell surface (subpanel 1), suggesting their subsequent release as EVs. Released PalmGFP-EVs were readily observed around the microenvironment of 293T-PalmGFP cells (subpanel 2).

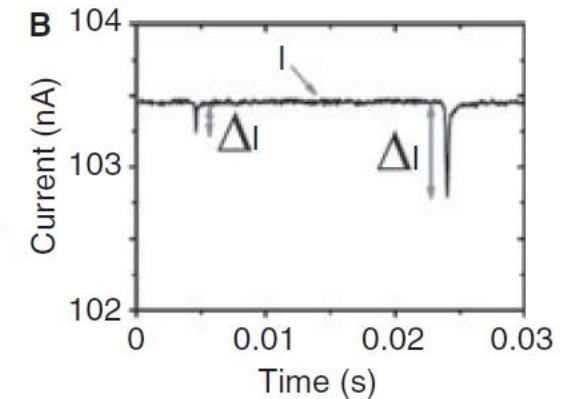
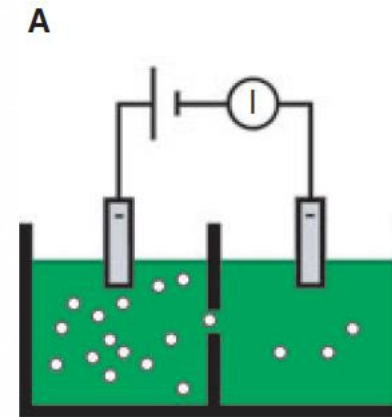
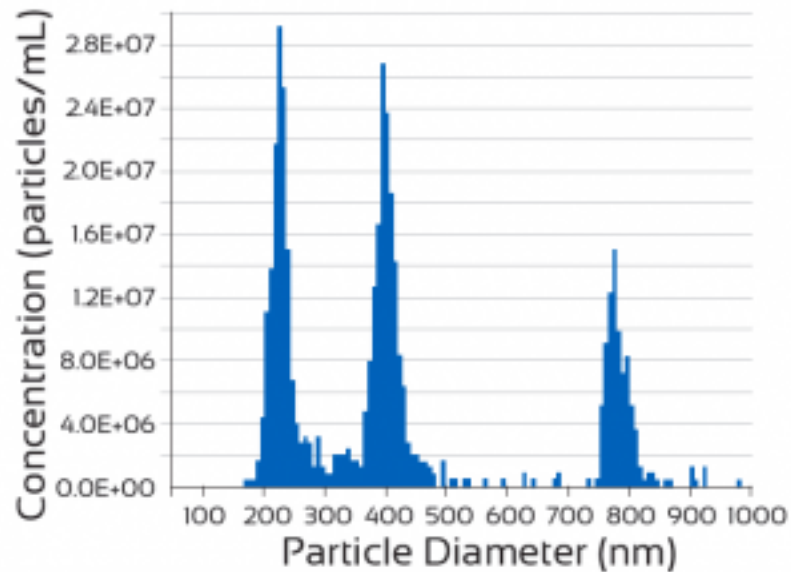
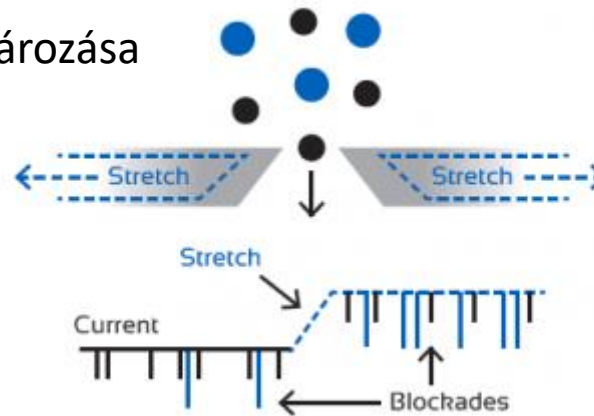
II. REZISZTÍV PULZUS ÉRZÉKELÉS - TRPS



II. REZISZTÍV PULZUS ÉRZÉKELÉS - TRPS

TUNABLE RESISTIVE PULSE SENSING

Vezikula szám felmérése és méreteloszlás meghatározása



II. PROTEIN-LIPID ARÁNY ASSAY

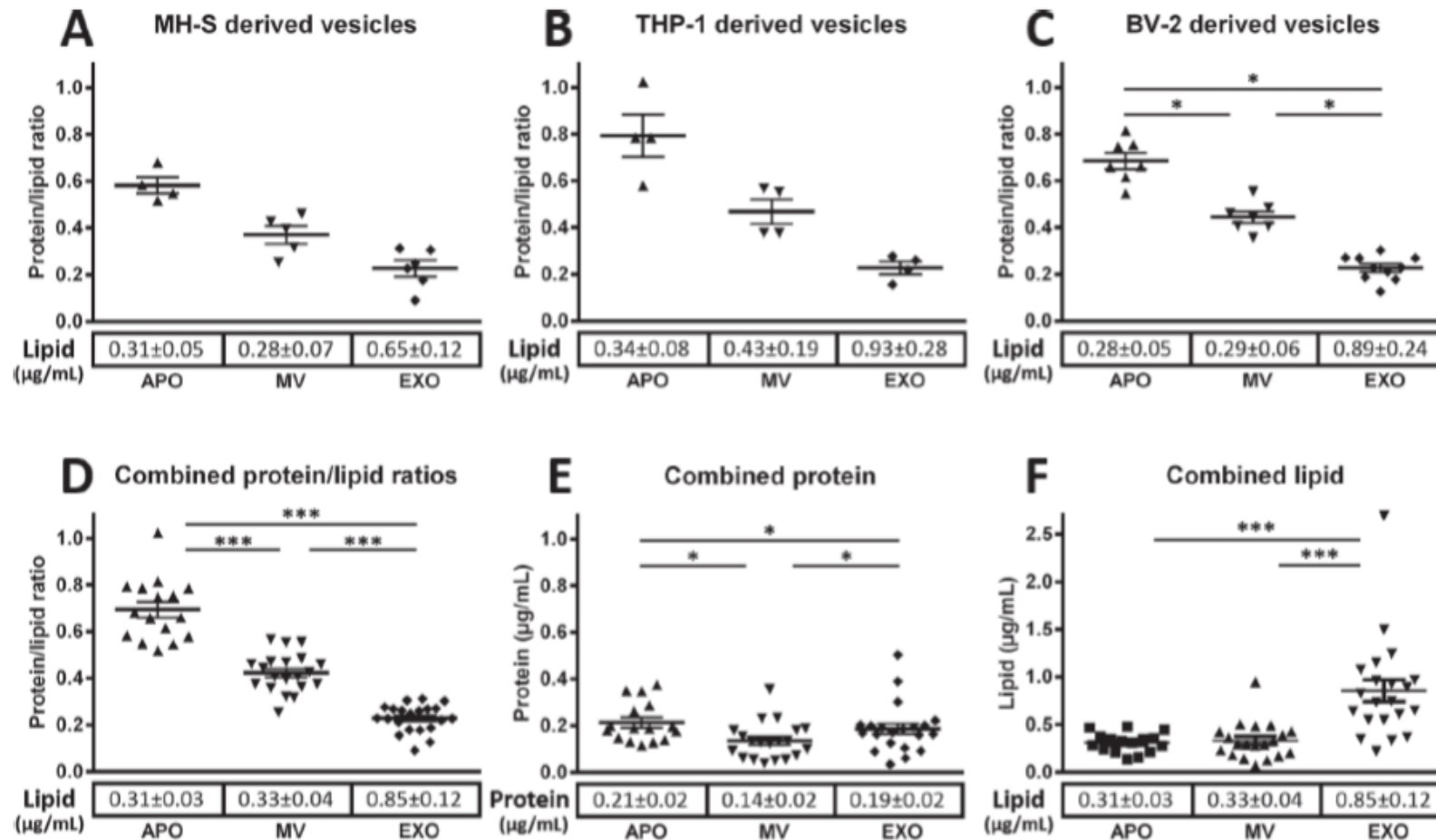
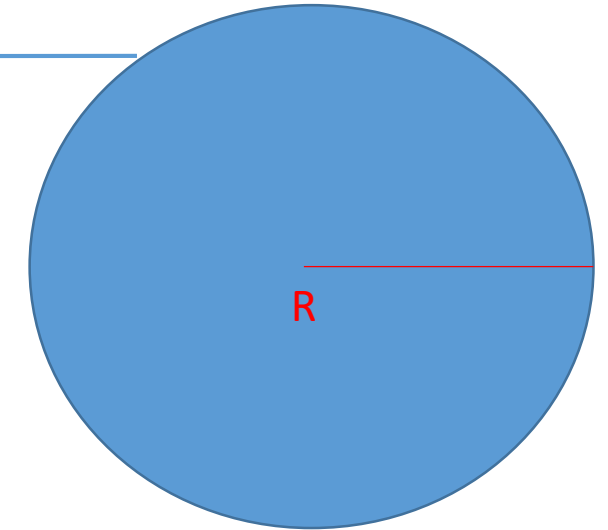
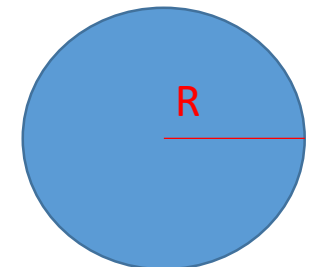


Fig 3. Protein to lipid ratios of EV subpopulations. Protein to lipid ratios are presented for APOs, MVs, and EXOs isolated from MH-S (A), THP-1 (B), and BV-2 (C) cell lines (data represent ≥ 3 independent experiments for each EV type from all cell lines). Combined protein to lipid ratios obtained using EVs derived from MH-S, THP-1, BV-2, Jurkat, U937 as well as from human blood plasma are shown (D) (results of ≥ 12 independent experiments each EV type). Combined protein (E) and lipid concentrations (F) for the above cell line derived and blood plasma derived EVs are also shown. Mean values are represented by horizontal lines, and standard error means (SEMs) are indicated by error bars. The mean values \pm SEM of lipid and protein concentrations ($\mu\text{g/mL}$) of conditioned media are reported below each respective EV subpopulation.



$$V_{\text{gömb}} = \frac{4 \cdot R^3 \cdot \pi}{3}$$

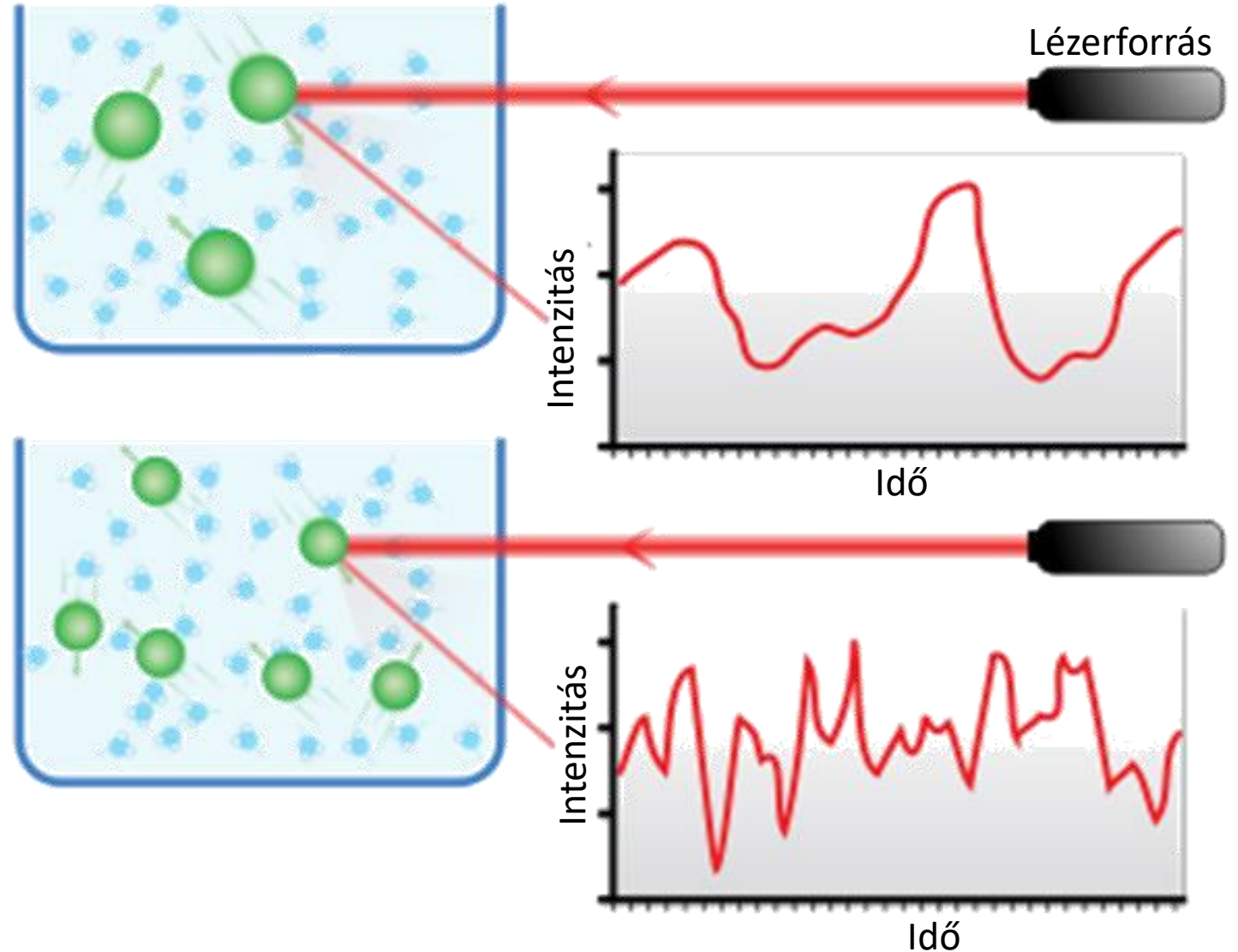
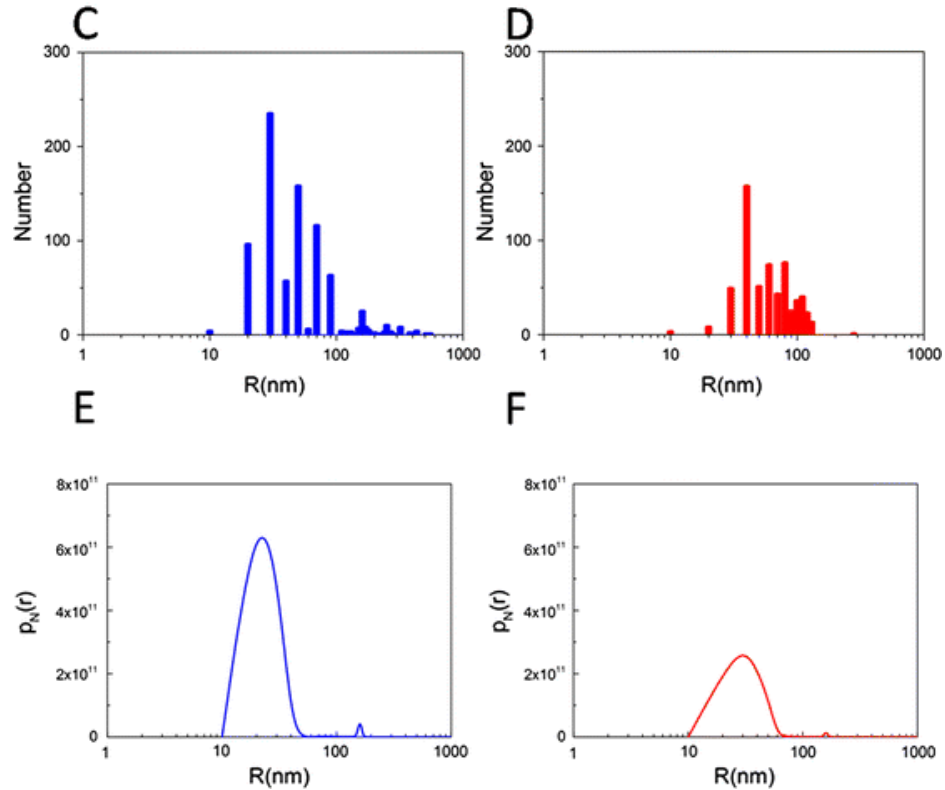


$$A_{\text{gömb}} = 4 \cdot R^2 \cdot \pi$$

II. DINAMIKUS FÉNYSZÓRÁS- DLS

DYNAMIC LIGHT SCATTERING

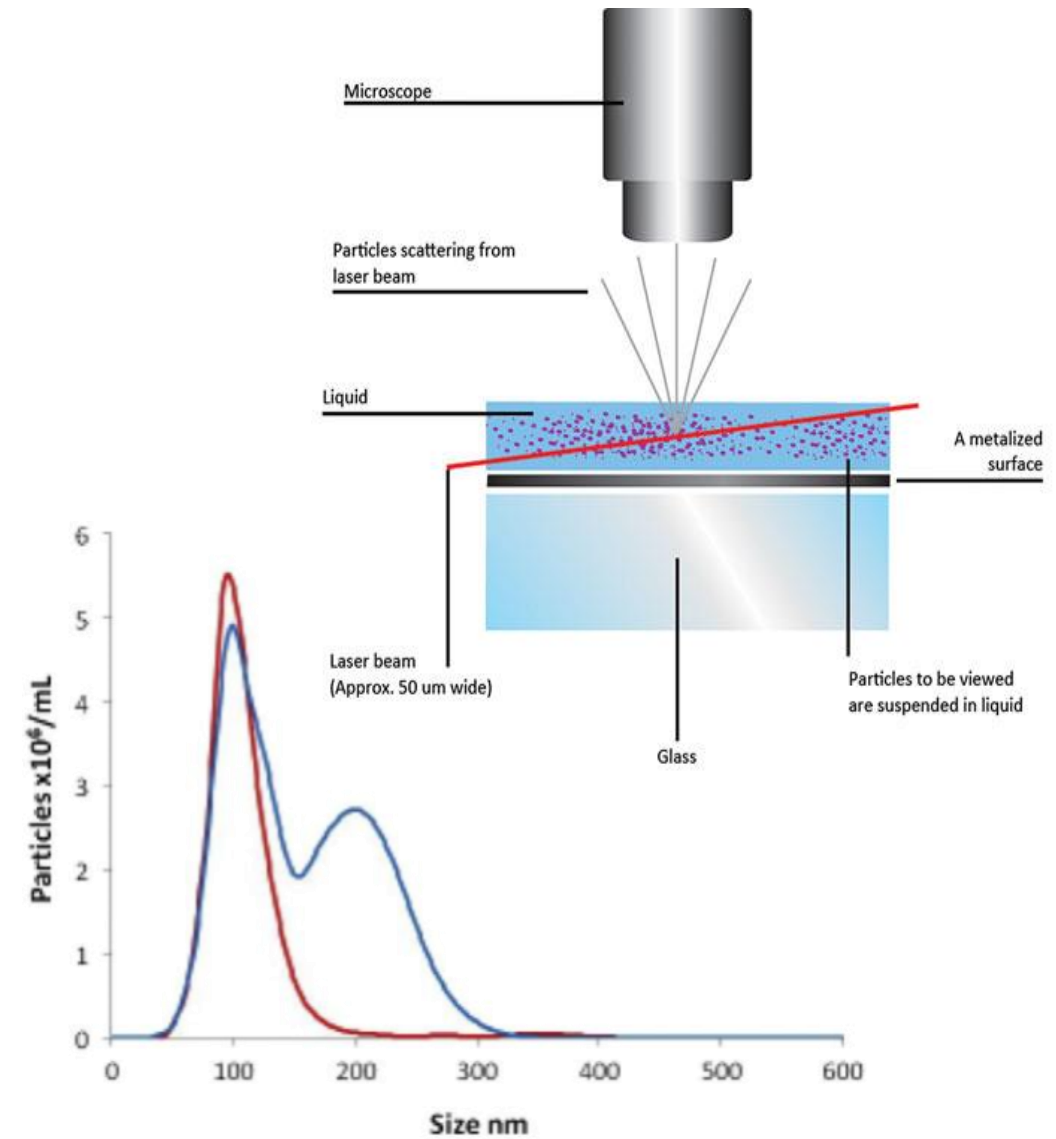
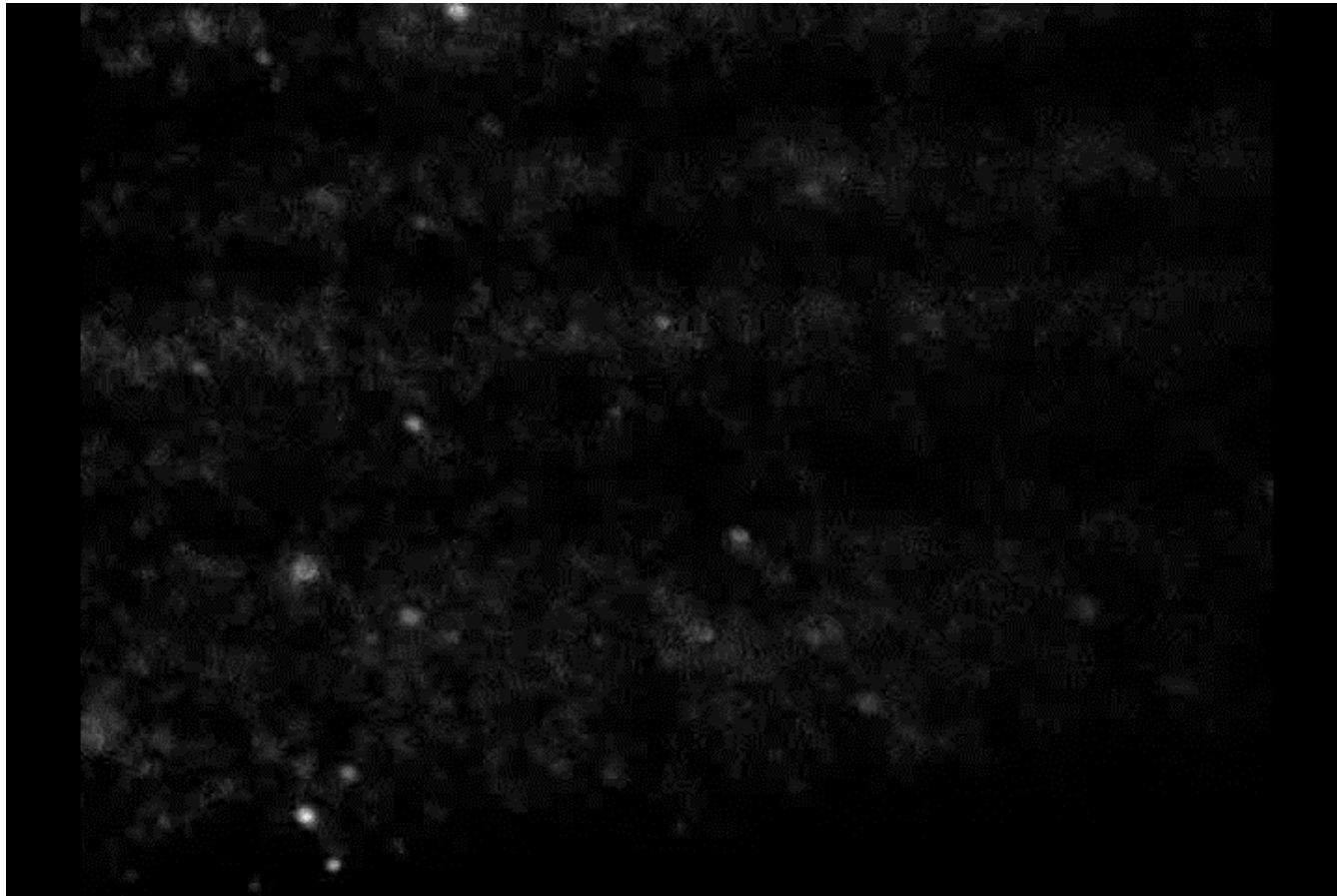
Méreteloszlás



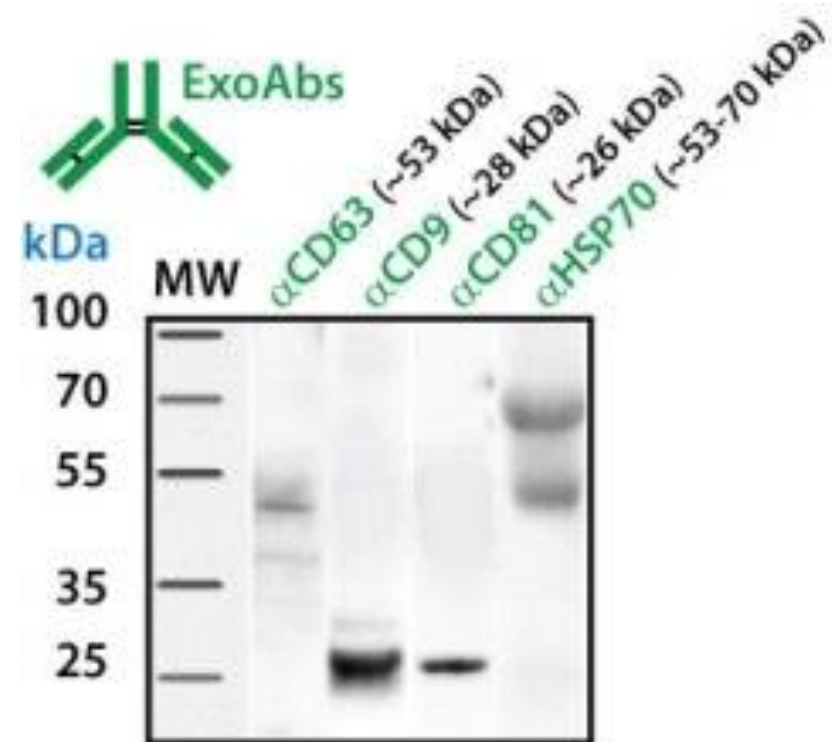
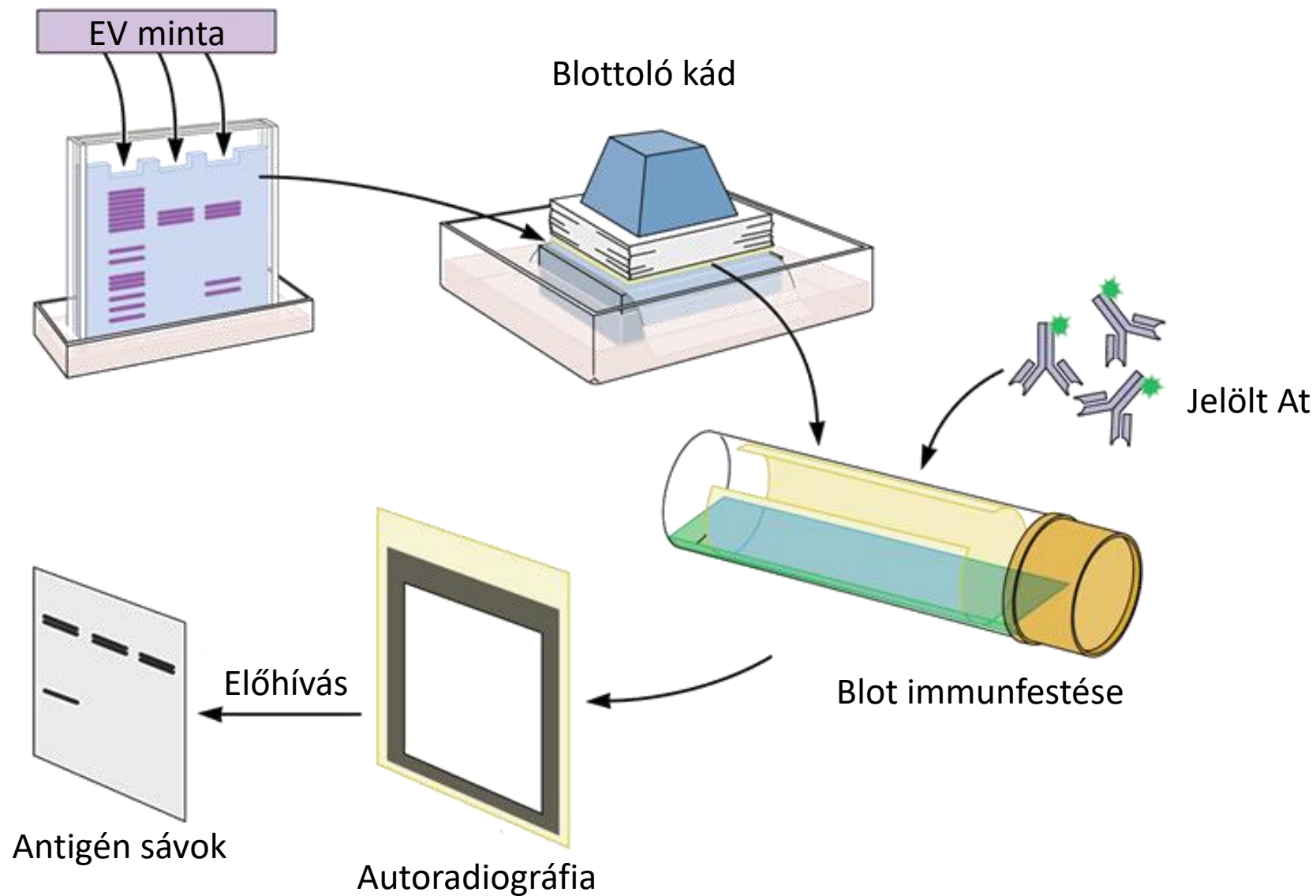
II. NANOPARTIKULUM KÖVETŐ ANALÍZIS- NTA

NANOPARTICLE TRACKING ANALYSIS

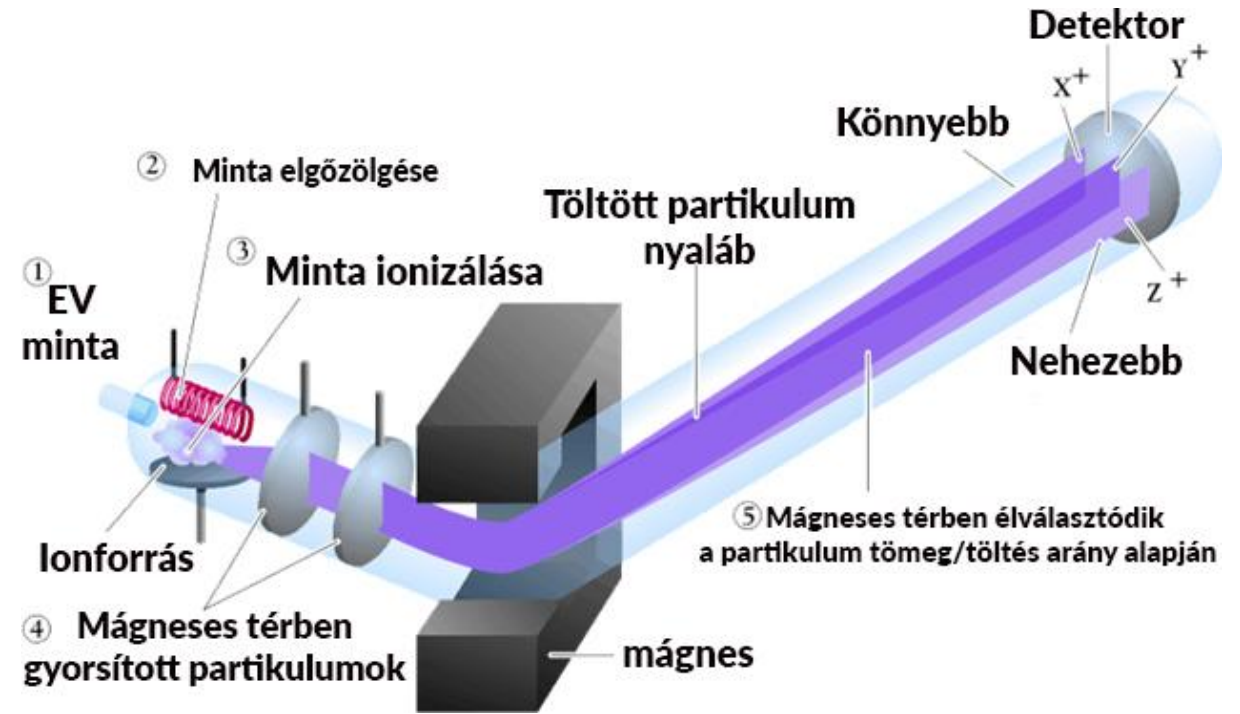
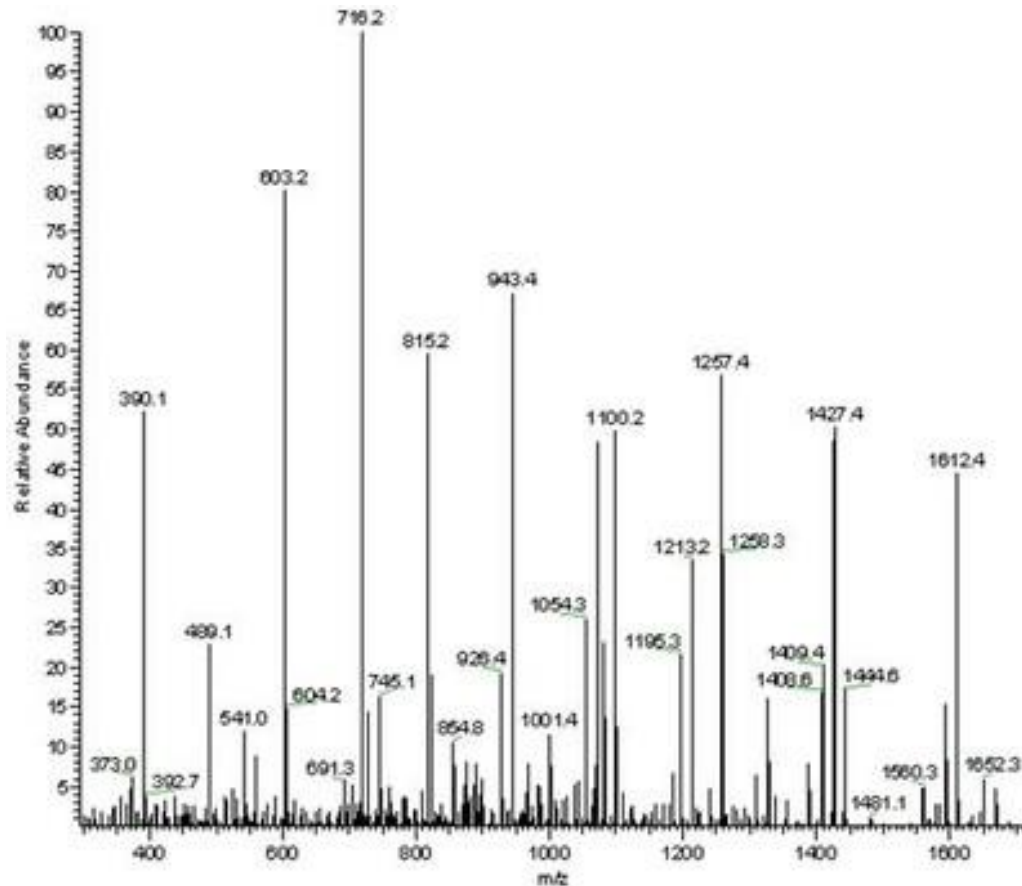
Vezikula szám felmérése és méreteloszlása



II. WESTERN BLOT



II. TÖMEGSPEKTROMETRIA



II. PROTEIN MICROARRAY

ELISA alapú módszerek

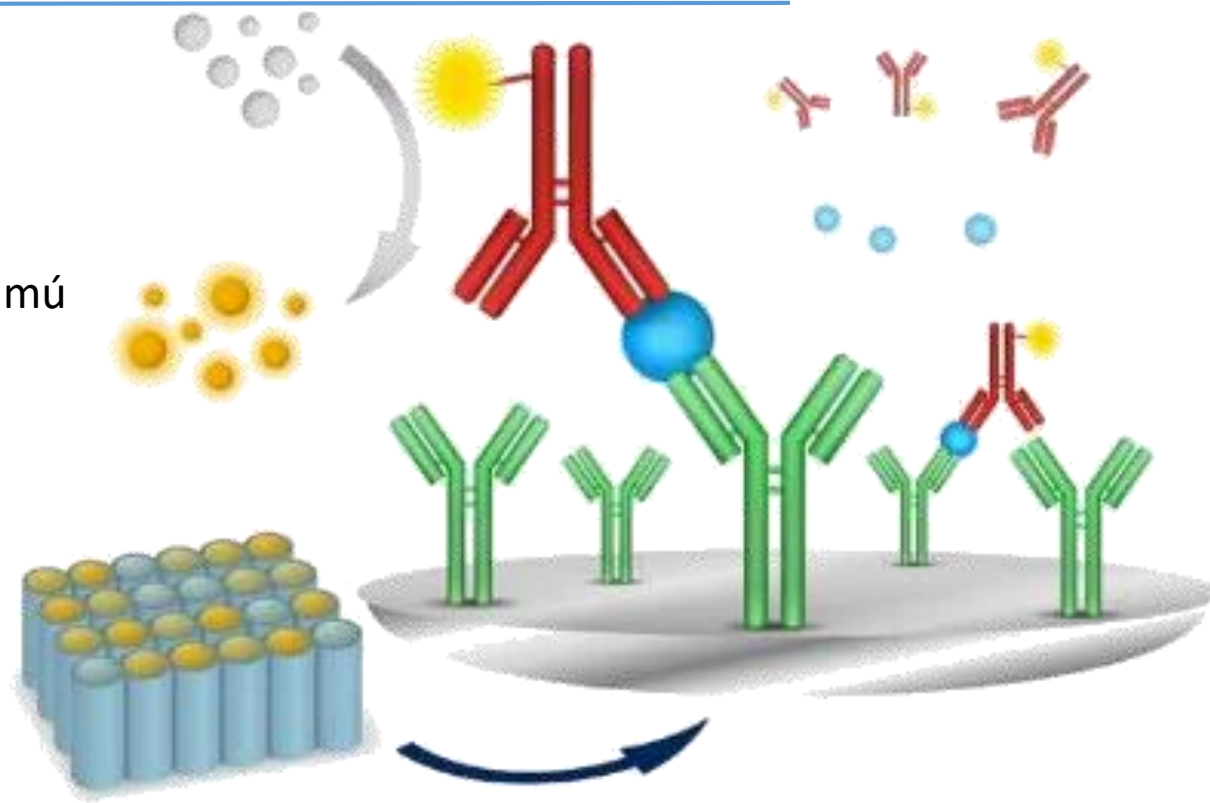
Exosearch

Immunochip

Specifikus kvantifikációja EV alpopulációknak nagy számú mintában

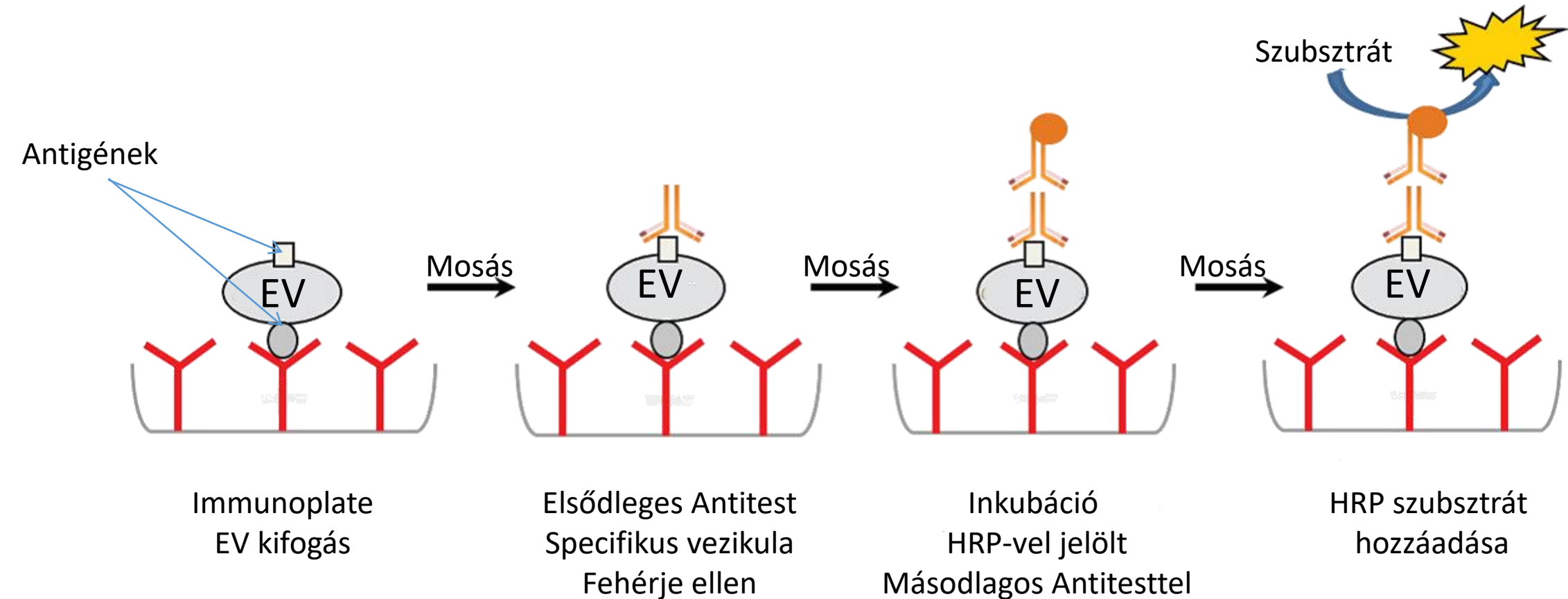
Például: CD9, CD63, CD81

Akár: 10uL plazmából

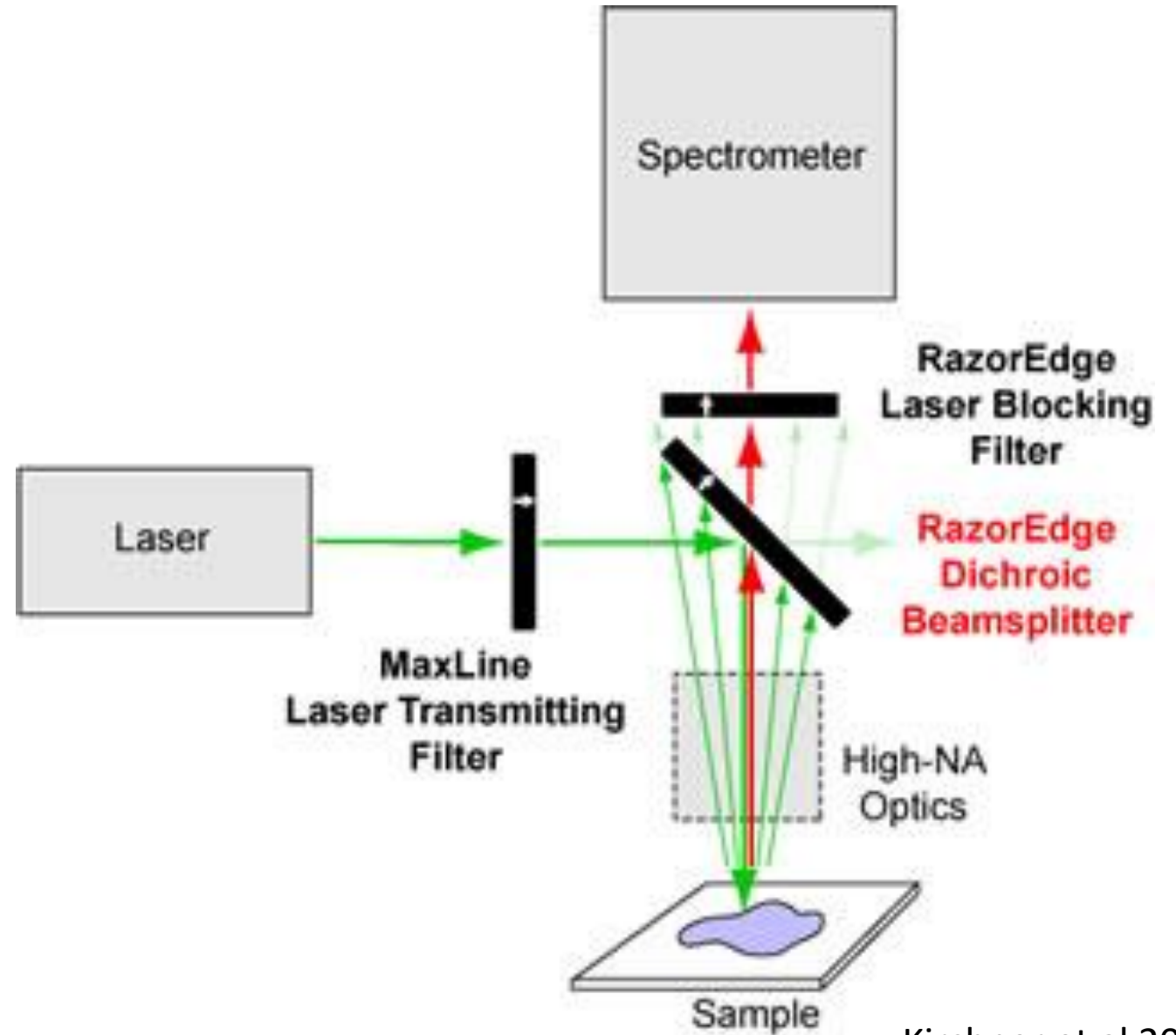
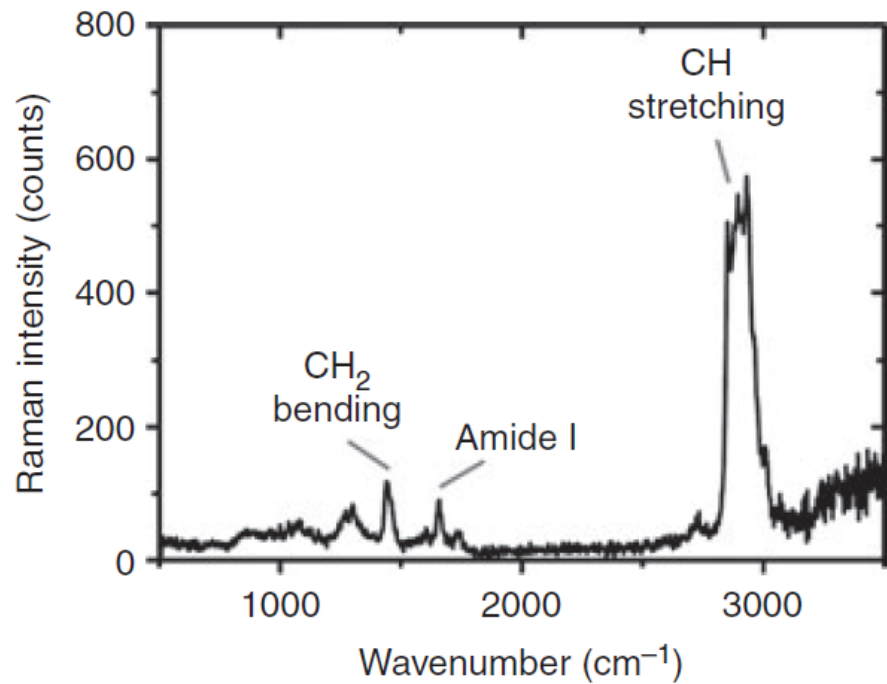


II. ELISA

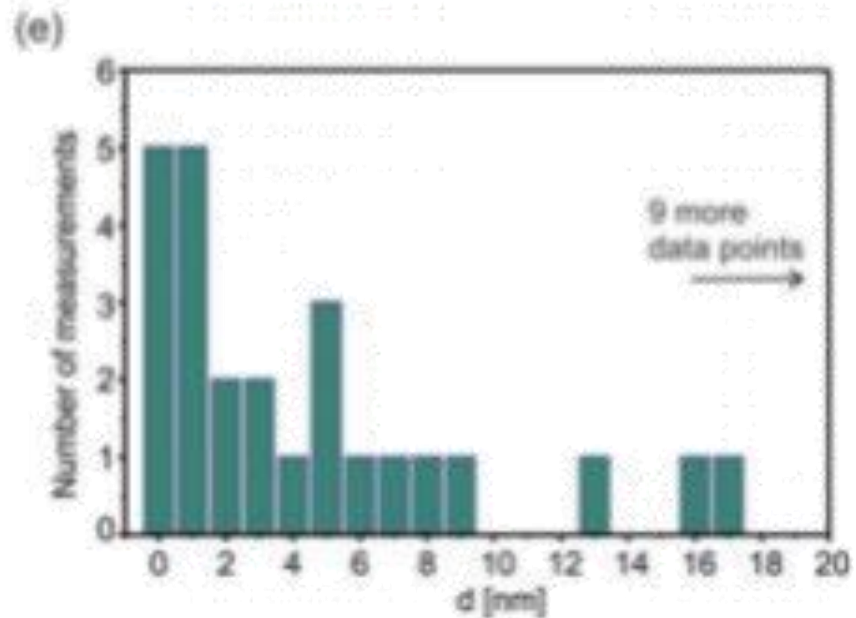
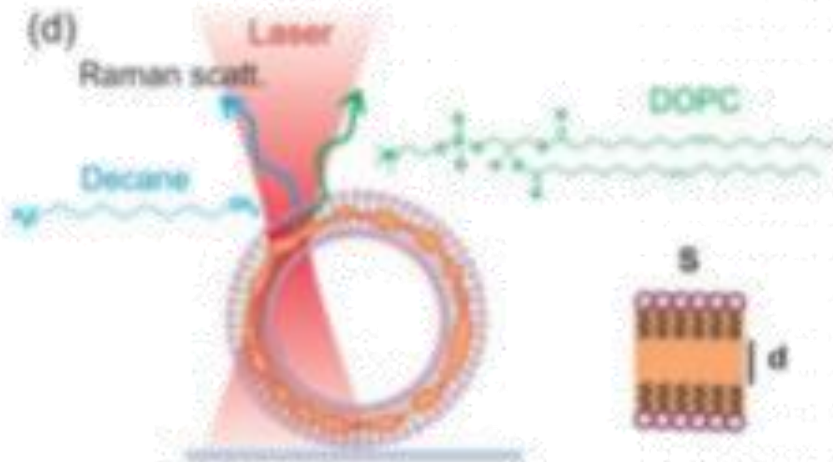
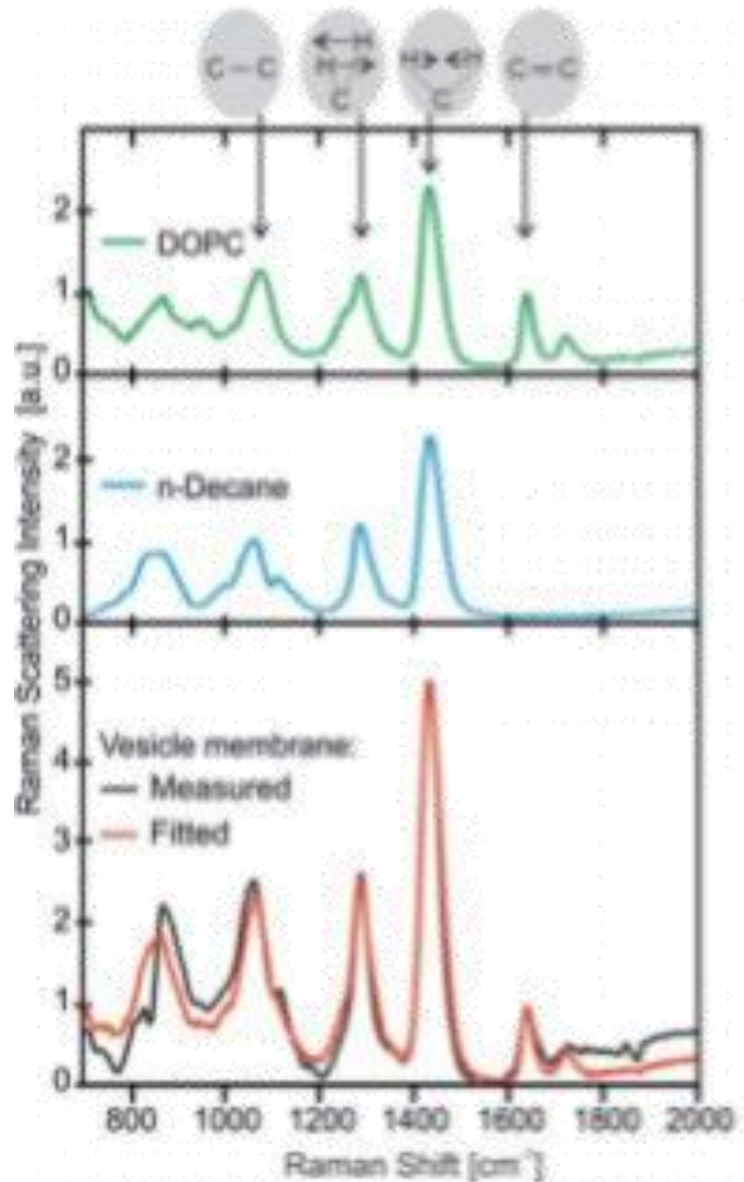
Egy időben sok minta feldolgozására ad lehetőséget



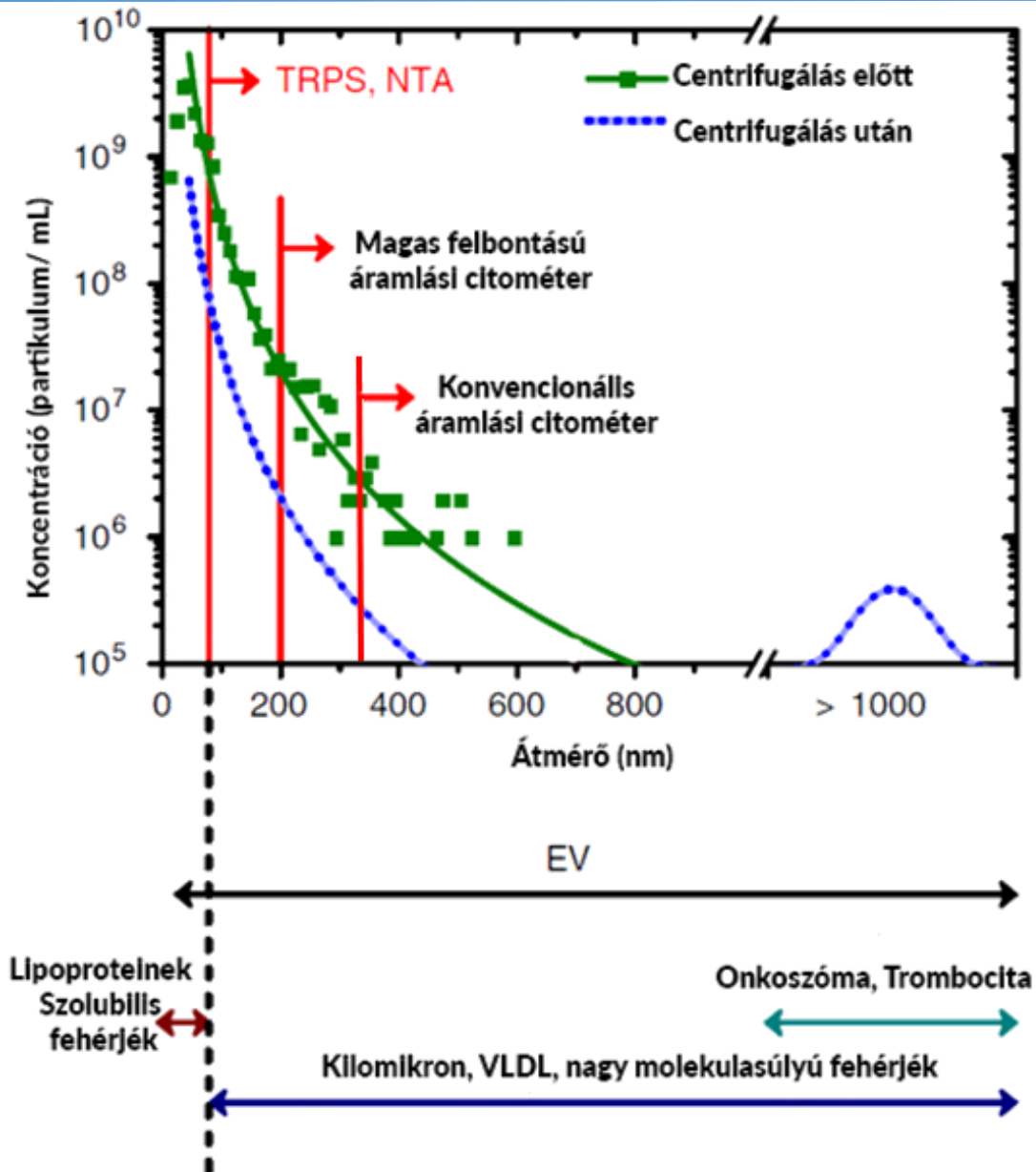
II. RAMAN SPEKTROSKÓPIA (1)



II. RAMAN SPEKTROSKÓPIA (2)



ÖSSZEGZÉS (1)

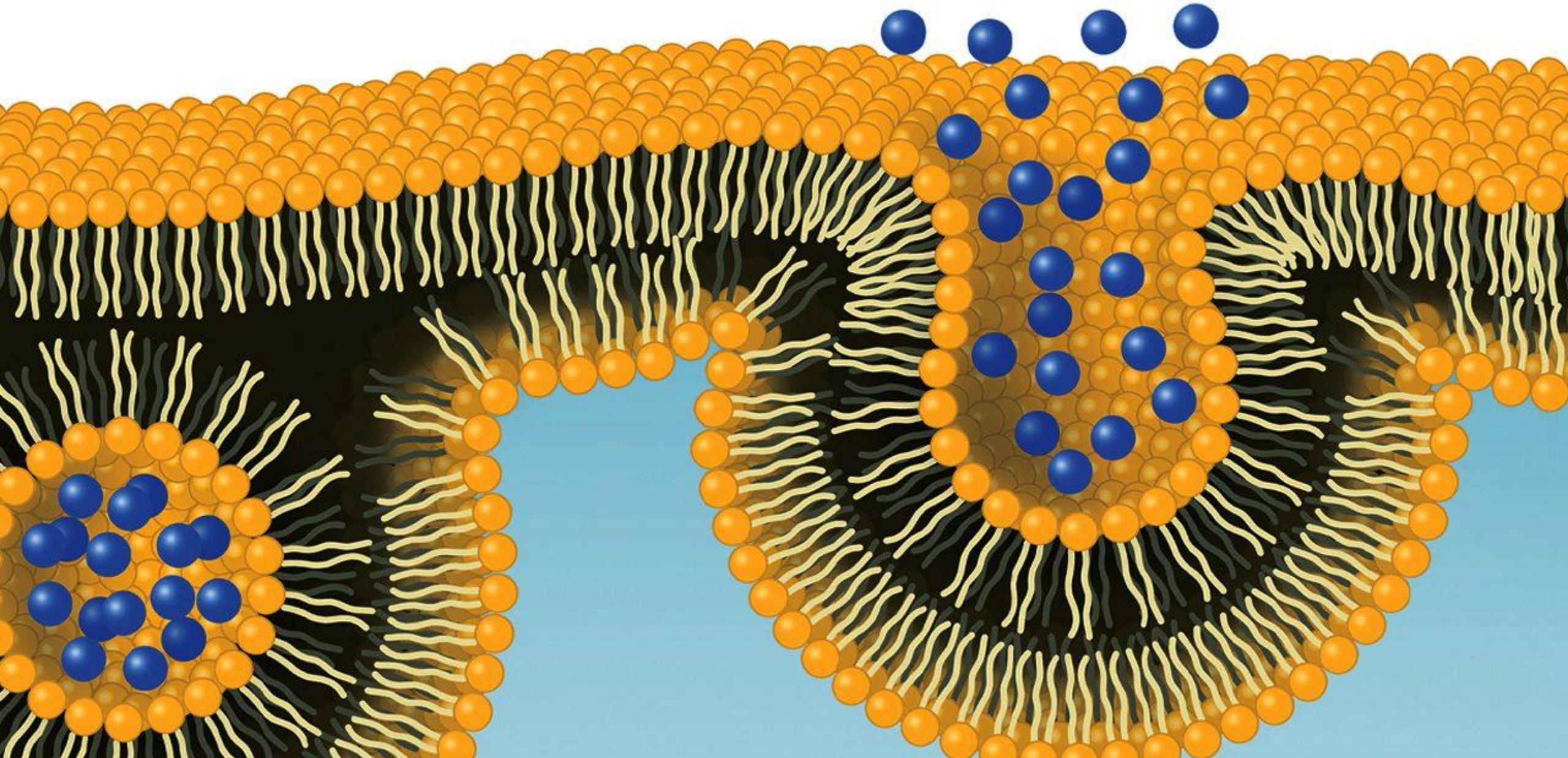


	ELMI	AFM	ImagestreamX
Vizualizálás	+	+	+
Magas áteresztőképes ségű módszer	-	-	+
Detekciós határ	2-5 nm	0.5-1 nm	100 nm
Fenotipizálás	+	-	+
Időigényes	+	+	-

MESSAGE TO TAKE HOME

A rendelkezésre álló izolálási és detektálási módszerek palettája lehetővé teszi a különböző extracelluláris vezikula populációk és alpopulációk elkülönítését és jellemzését. Ennek feltétele a vizsgálati minta ismerete, a biológiai kérdés valamint az adott minta potenciális szennyeződési faktorai függvényében történő izolálási és detektálási módszerek kiválasztása/ együtt alkalmazása.

EV szerepe a kardiovaszkuláris megbetegedésekben: 2016. 10. 26



KÖSZÖNÖM SZÉPEN A FIGYELMET!

